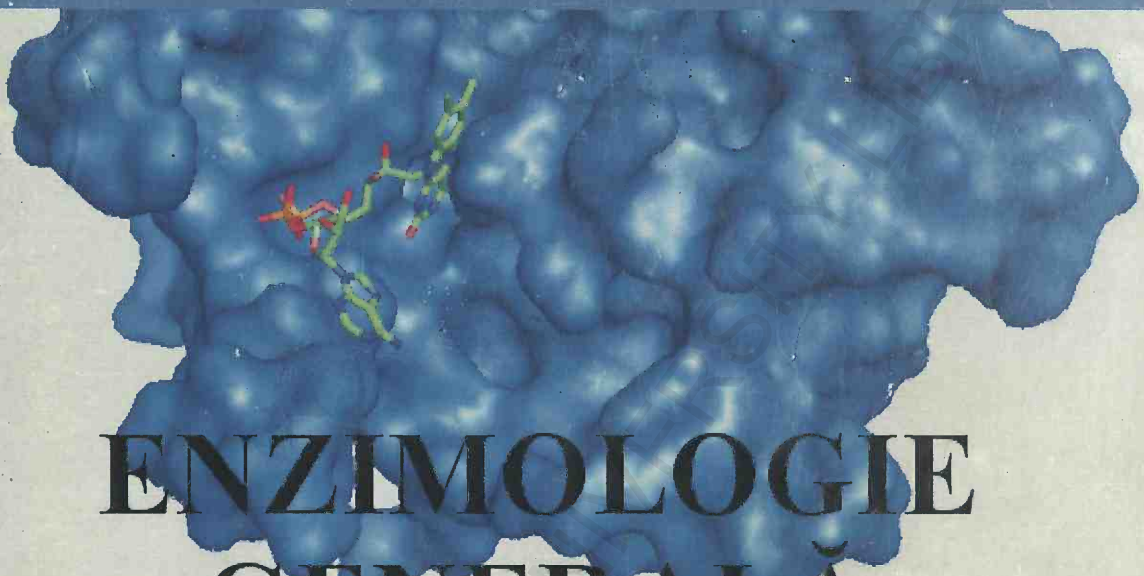
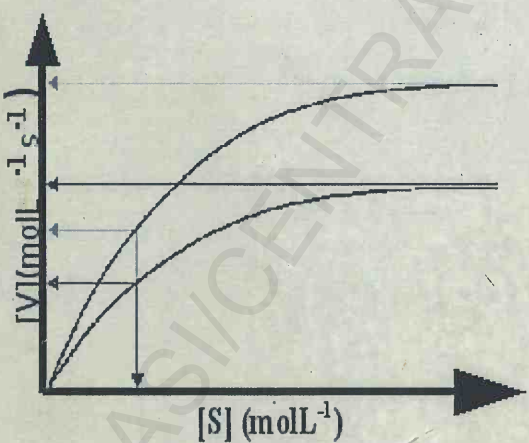
D.C. COJOCARU ZENOVIA OLTEANU
ELENA CIORNEA LĂCRĂMIOARA OPRICĂ
SABINA-IOANA COJOCARU



ENZIMOLOGIE GENERALĂ



editura
Tehnopress
IAŞI-2007

12.103

BIBL. CENTR. UNIV.
M. „EMINESCU" IAȘI
BIOLOGIE
III-12.103

BCU IAȘI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

acu III -12/03

D. C. COJOCARU
ZENOVIA OLTEANU
ELENA CIORNEA
LĂCRĂMIOARA OPRICĂ
SABINA-IOANA COJOCARU

27.II.
41,29 Lei

ENZIMOLOGIE GENERALĂ

659289
B.C.U. IASI

editura Tehnopress
IAŞI - 2007

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Referent ştiinţific

Prof. Emérite **Jean MONTREUIL**
Université des Sciences et Technologies Lille-1, France,
Membre d'Honneur de l'Académie Roumaine,
Docteur *Honoris causa* de l'Université „Alexandru Ioan Cuza" Iaşi;

Prof. dr. **Anca DINISCHIOTU**
Catedra de Biochimie şi Biologie Moleculară
Universitatea din Bucureşti
Prodecanul Facultăţii de Biologie;

Prof. dr. **Marieta COSTACHE**
Catedra de Biochimie şi Biologie Moleculară,
Universitatea din Bucureşti,
Şeful Centrului de Biologie Moleculară

B.C.U. „M. EMINESCU" IAŞI
BIOLOGIE
20 JUN 2008

EDITURA TEHNOPRESS
Str. Zimbrului nr.17
700047 Iaşi
Tel./fax: 0232 260092
E-mail: office@tehnopress.ro
http://www.tehnopress.ro
EDITURĂ ACREDITATĂ CNCSIS

ISBN 978-973-702-451-0

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

PREFAȚĂ

Evoluția spectaculoasă pe care a cunoscut-o enzimologia în ultimele decenii este strâns legată de progresele remarcabile înregistrate în studiul organizării structurale a proteinelor. Acestea au contribuit decisiv la înțelegerea mecanismelor intime de acțiune a enzimelor. Studiile asupra cineticii reacțiilor chimice au contribuit, de asemenea, la îmbogățirea cunoștințelor în acest domeniu, în particular prin introducerea metodelor de cinetică rapidă în enzimologie.

Parte integrantă a biochimiei, ***enzimologia*** se ocupă cu studiul răspândirii și localizării enzimelor în organismele vii, structurii lor chimice, cineticii reacțiilor enzimatice, mecanismelor de acțiune și reglării activității enzimelor, utilizării practice a acestora etc.

Considerată astăzi de mulți specialiști ca știință de sine stătătoare, enzimologia are numeroase implicații practice în cele mai diverse domenii ale activității umane: medicină, industrie (alimentară, textilă și de medicamente), chimie analitică etc. În același timp, studiul enzimelor sub toate aspectele prezintă o importanță deosebită din punct de vedere fundamental, contribuind la înțelegerea mecanismelor moleculare ce stau la baza transformărilor metabolice din celula vie și la dezvoltarea altor științe moderne și domenii interdisciplinare cum ar fi biologia moleculară, genetica și ingineria genetică, microbiologia, fiziologia animalelor, plantelor și microorganismelor, biotehnologia și altele. Toate acestea reprezintă argumente de netăgăduit ce pledează în favoarea utilității enzimologiei atât pentru biochimiști cât și pentru specialiștii din domenii conexe: microbiologi, geneticieni, medici, farmaciști, chimiști cu preocupări în domeniul chimiei analitice și chimiei organice, ingineri din industria alimentară, textilă, farmaceutică etc.

Prezenta lucrare reprezintă o sistematizare a literaturii de specialitate românești și străine din domeniul enzimologiei. Sunt analizate aspecte legate de definirea noțiunii de enzimă, nomenclatura și clasificarea enzimelor, proprietățile generale și structura lor chimică (cu detalierea aspectelor legate de natura chimică și mecanismele generale de acțiune ale coenzimelor) etc. În lucrare se sistematizează de asemenea, principalele date referitoare la cinetica reacțiilor enzimatice, metode și tehnici utilizate în enzimologie, mecanisme

generale de acțiune ale enzimelor, aspecte energetice ale reacțiilor enzimatice, reglarea activității enzimelor ș.a. Mai sunt incluse în lucrare unele aspecte legate de imobilizarea enzimelor pe suporturi insolubile și utilizarea practică a enzimelor libere și imobilizate.

Un loc aparte îl ocupă rezultatele experimentale proprii obținute în cercetările noastre privind separarea și purificarea unor enzime, studiul caracteristicilor cinetice ale acestora, imobilizarea enzimelor și a sistemelor enzimatice celulare pe suporturi solide precum și caracterizarea preparatelor obținute.

Lucrarea are la bază cursul de ***Enzimologie*** predat studenților de la secțiile de **Biochimie** și **Biochimie tehnologică** ale Universității "Alexandru Ioan Cuza" Iași și se adresează, în primul rând studenților de la secțiile de ***Biochimie, Biochimie tehnologică, Biologie, Ecologie*** dar și studenților de la facultățile de ***Medicină, Farmacie, Medicină veterinară, Chimie*** etc. În egală măsură ea se adresează cadrelor didactice și cercetătorilor cu preocupări în domeniu.

Suntem deosebit de recunoscători specialiștilor și celor interesați din domeniile menționate mai sus pentru eventualele observații și sugestii referitoare la concepția și conținutul prezentei lucrări.

Iași, 2007

Autorii

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITARY LIBRARY

I. SCURT ISTORIC AL DEZVOLTĂRII ENZIMOLOGIEI

Încă din antichitate se cunoşteau diferite procese de transformare realizate de către organismele vii, în special microorganisme (obţinerea vinului, oţetului, pâinii etc.). Mult timp însă, mecanismele moleculare ce stau la baza acestor procese, locul şi rolul enzimelor în desfăşurarea lor au rămas total necunoscute. Chiar şi astăzi, multe mecanisme de acţiune ale enzimelor precum şi unele procese biochimice rămân încă neelucidate.

Primele noţiuni ştiinţifice de enzimologie apar la începutul secolului XIX însă dezvoltarea rapidă a acestei ramuri a biochimiei s-a realizat abia în ultimele decenii. Ţinând cont de multitudinea proceselor biochimice neelucidate încă, precum şi de importanţa practică imensă a enzimelor (acestea constituind obiectul de studiu al unuia din domeniile prioritare ale biotehnologiei) se poate afirma cu certitudine că şi în secolul XXI enzimologia va cunoaşte o dezvoltare spectaculoasă.

Primele date ştiinţifice ce au condus mai târziu la definirea noţiunii de enzimă au apărut în 1833 când *Persoz* şi *Payen* obţin un "principiu activ" din extractele apoase de germeni de orz, capabil să hidrolizeze amidonul. Prin precipitări repetate cu etanol, autorii reuşesc să îl purifice sub forma unei pulberi, numind preparatul obţinut ***diastază*** (*gr.* $\delta\iota\delta\alpha\tau\alpha\lambda\iota\sigma$ = *separare*).

După formularea conceptului de cataliză de către *Berzelius* în 1834-1837, acesta sugerează că diferite fenomene biologice cum ar fi digestia şi fermentaţia pot fi realizate de unii catalizatori specifici lumii vii. În perioada imediat următoare, această teorie a fost confirmată prin descoperirea ***pepsinei*** gastrice, a ***emulsinei*** din migdale, ***lipazei*** şi ***tripsinei*** pancreatice, ***invertazei*** din drojdii şi a altor enzime. Pentru toate aceste substanţe, *Khun* propune în 1877, denumirea de **enzimă** care, în limba greacă înseamnă **"în drojdii"**. În perioada respectivă se mai utiliza şi termenul de **ferment** (de la latinescul *ferveo* = *fierbere*), însă primul termen a fost treptat acceptat de marea majoritate a cercetătorilor.

În 1860 începe o dispută ştiinţifică între *Pasteur* şi *Liebig*, nerezolvată timp de 37 de ani. În această dispută, *Pasteur* susţinea noţiunea de ***fermenţi organizaţi***, atribuită celulelor microbiene integre capabile să realizeze procese fermentative, în timp ce *Liebig* utilizează noţiunea de ***ferment solubil*** pe

care o atribuie principiului activ sintetizat de celulele vii şi nu celulelor intacte. Teoria lui *Liebig* a avut câştig de cauză, fiind confirmată în 1897 de către fraţii *Büchner* care au demonstrat că extractul acelular obţinut din celule de *Saccharomyces cerevisiae* păstrează întreaga activitate catalitică a celulelor din care a fost obţinut.

La sfârşitul secolului XIX apare şi prima teorie asupra mecanismului de acţiune a enzimelor şi anume ***teoria lacătului şi a cheii*** elaborată de *Fischer*, conform căreia, în procesul catalitic, enzima recunoaşte substratul datorită unei similitudini structurale între molecula substratului şi centrul activ al enzimei, această asemănare fiind comparată cu cea existentă între un lacăt şi cheia lui.

Chiar şi după elaborarea acestei teorii, structura chimică a enzimelor a rămas foarte mult timp neelucidată. Astfel, ediţia din 1929 a Enciclopediei Britanice arată că "***enzimele par a fi proteine, dar aceasta nu este sigur***".

În primii ani ai secolului XX se pun bazele cineticii enzimatice prin cercetările lui *Henri* şi *Brown*, iar în 1913 se realizează prima exprimare matematică a cineticii reacţiilor enzimatice cu un singur substrat de către *Michaelis* şi *Menten*. Studiile de cinetică enzimatică au fost ulterior dezvoltate prin cercetările unor biochimişti de frunte ai lumii: *Haldane, Lineweaver, Burk, Chance, Theorel, Dixon, Webb* şi alţii.

Studiul structurii chimice a enzimelor a fost posibil abia după elaborarea metodelor de izolare şi purificare a proteinelor în general şi a enzimelor în special, din sursele biologice.

Din acest punct de vedere, o importanţă deosebită o prezintă separarea, purificarea şi cristalizarea ***ureazei*** de către *Sumner* în 1926 şi demonstrarea structurii ei proteice. A urmat o perioadă de intense cercetări când au fost cristalizate ***pepsina, tripsina, chimotripsina*** etc. După 1940, în paralel cu cercetările de cinetică enzimatică, în aproape toate laboratoarele din lume s-au efectuat experimente privind separarea şi purificarea enzimelor din cele mai diferite surse biologice, atât de natură microbiană cât şi vegetală şi animală.

Sfârşitul secolului XX este marcat de apariţia şi dezvoltarea unei noi direcţii de cercetare în enzimologie cu largi implicaţii în biotehnologie – imobilizarea enzimelor, organitelor celulare şi a celulelor întregi pe suporturi solide. Biocatalizatorii heterogeni astfel obţinuţi şi-au găsit deja largi aplicaţii în medicină, industria alimentară şi de medicamente, chimia analitică, epura-

rea apelor reziduale şi alte domenii ale activităţii umane. Din acest punct de vedere, sunt cunoscute cercetările efectuate în Japonia (*Chibata, Furui, Miura, Ishimori* şi alţii), Franţa (*Durand, Monsan, Lilly, Bouquelet, Guillochon* şi alţii), SUA (*Edwards, Kennedy*), Germania (*Atrat, Messing, Stottmeister*), Italia (*Campanella, Parascandola, Salvadore*), Rusia (*Berezin, Kosceenco, Iaropolov, Zueva*) şi alte ţări. În ţara noastră se remarcă cercetările efectuate în laboratorul condus de regretatul doctor *Horst Schell*, specialist de mare valoare al biochimiei româneşti.

În Laboratorul de Biochimie de la Universitatea "Alexandru Ioan Cuza" din Iaşi a fost testată posibilitatea imobilizării *catalazei, invertazei, α-amilazei ,pepsinei, tripsinei, glucoamilazei, papainei* etc, precum şi a celulelor de *Saccharomyces cerevisiae, Sarcina lutea, Artrobacter sp.* şi altele utilizându-se în acest scop diferite suporturi naturale sau sintetice: răşini schimbătoare de ioni de tip ***Ponilex***, celuloză, Xanthan, copolimeri de tip acrilic etc.

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

II. NOȚIUNI GENERALE

II.1 PROPRIETĂȚILE GENERALE ALE ENZIMELOR

Toate enzimele cunoscute până în prezent sunt substanțe de natură proteică și îndeplinesc rol de catalizatori ai transformărilor biochimice din celula vie. Fiind biocatalizatori, enzimele prezintă toate proprietățile generale ale catalizatorilor chimici:

- măresc viteza reacțiilor chimice posibile din punct de vedere termodinamic prin scăderea energiei de activare și instalarea mai rapidă a stării de echilibru;
- activitatea catalitică se manifestă la concentrații mici, mediul de reacție conținând concentrații relativ mari de substrat;
- la sfârșitul transformării se regăsesc în mediu nemodificați din punct de vedere cantitativ și calitativ.

Fiind proteine, enzimele prezintă toate proprietățile fizico-chimice ale acestor macromolecule. Din această cauză, metodele și tehnicile folosite în biochimia proteinelor în general (separare, purificare, dozare etc.) se aplică și în enzimologie. Datorită faptului că acționează în celula vie, enzimele mai prezintă o serie de proprietăți ce diferențiază net cataliza enzimatică de cea chimică. În primul rând, ***eficiența catalitică*** a enzimelor este cu mult mai mare comparativ cu cea a catalizatorilor chimici. Enzimele acționează în ***condiții blânde*** de temperatură, pH, presiune osmotică etc., spre deosebire de catalizatorii chimici care acționează în general, în condiții dure de reacție (fig. 1).

Cea mai importantă proprietate a enzimelor, total neîntâlnită în cataliza chimică, o constituie înalta ***specificitate de acțiune*** a acestora, ceea ce înseamnă că o enzimă catalizează transformarea unui singur substrat și doar în cazuri rare a unui grup restrâns de substanțe înrudite structural. În funcție de modul de manifestare, specificitatea de acțiune a enzimelor poate fi de mai multe tipuri: specificitate de reacție, de substrat, absolută de grup, relativă de grup, stereospecificitate etc.

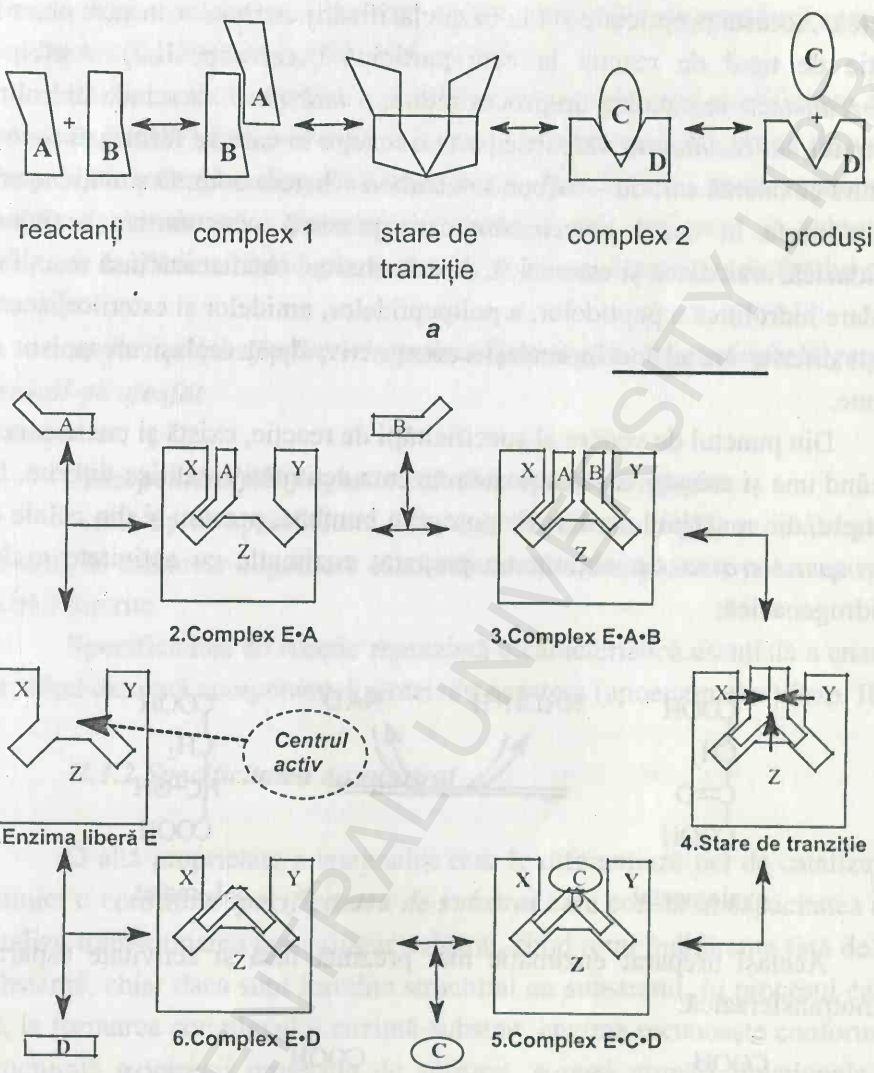


Fig. 1. Reprezentarea schematică a realizării unei reacții chimice (a) comparativ cu cea a unei reacții enzimatice (b) (Koolman, J. et al. – 2005)

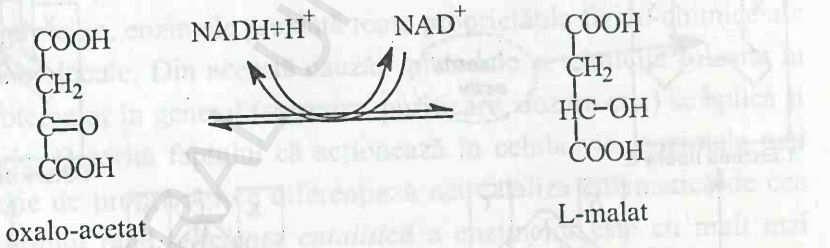
II.1.1 Specificitatea de reacție

Specificitatea de reacție este tipul de specificitate cel mai des întâlnit și constă în capacitatea enzimelor de a cataliza un anumit tip de reacție bio-

B.C.U. „M. EMINESCU" IAȘI
BIOLOGIE

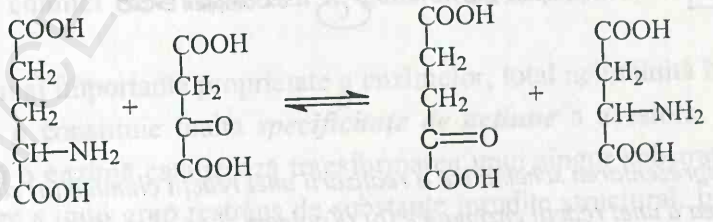
chimică. Această proprietate stă la baza clasificării enzimelor în şase clase în funcţie de tipul de reacţie la care participă (vezi cap. II.2). Astfel, o *oxidoreductază* va cataliza un proces redox, o *hidrolază* va scinda hidrolitic substratul, iar o *sintetază* va participa la o reacţie în care se formează o nouă legătură covalentă carbon – carbon sau carbon – heteroatom. O situaţie aparte se întâlneşte în cazul ***proteazelor*** care prezintă concomitent activitate peptidazică, amidazică şi esterazică. Aceste enzime catalizează însă reacţii de scindare hidrolitică a peptidelor, a polipeptidelor, amidelor şi esterilor, aceste reacţii diferite având loc în acelaşi centru activ, după acelaşi mecanism de acţiune.

Din punctul de vedere al specificităţii de reacţie, există şi unele excepţii, când una şi aceeaşi enzimă poate prezenta activităţi catalitice diferite. De exemplu, din muşchiul cardiac de porc, din bumbac, precum şi din celule de *Neurospora crassa* s-a obţinut un preparat enzimatic cu activitate malat-dehidrogenazică:



oxalo-acetat L-malat

Acelaşi preparat enzimatic mai prezintă însă şi activitate aspartat-aminotransferazică:



L-glutamat oxalo-acetat α-cetoglutarat L-aspartat

În asemenea situaţii, se presupune că enzimele respective conţin cel puţin doi centri activi, fiecare dintre aceştia catalizând câte un anumit tip de

reacție, după un mecanism specific, ceea ce înseamnă că manifestă specificitate de reacție, datorată fiecărui situs catalitic.

În fine, există situații când aceeași enzimă prezintă specificitate dublă sau chiar triplă, adică participă la reacții asemănătoare din punct de vedere chimic. De exemplu, ***dimetilaliltransferaza*** (EC 2.5.1.1) poate cataliza atât reacția de biosinteză a farnezilpirofosfatului prin utilizarea în calitate de substrate a 3,3-dimetil-alil-pirofosfatului și 3-izopentenil-pirofosfatului cât și reacțiile:

a) farnezilpirofosfat + izopentenilpirofosfat → pirofosfat + geranil-geranil-pirofosfat

și respectiv:

b) izopentenilpirofosfat → 3,3-dimetil-alil-pirofosfat.

Acest tip de specificitate de reacție (dublă sau triplă) se întâlnește, în general, la enzimele oligomere când subunitățile componente pot avea specificități diferite.

Specificitatea de reacție reprezintă o caracteristică esențială a enzimelor, fiind datorată componentei proteice a acestora (apoenzimelor) (cap. II. 3).

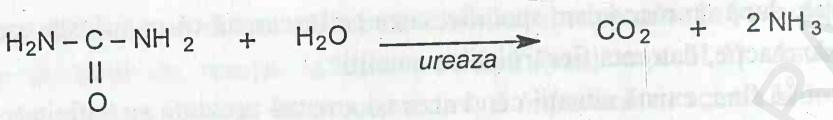
II.1.2 Specificitatea de substrat

O altă proprietate a enzimelor care le diferențiază net de catalizatorii chimici o constituie ***specificitatea de substrat*** care constă în capacitatea de a cataliza transformarea unui singur substrat, fiind total indiferente față de alte substanțe, chiar dacă sunt înrudite structural cu substratul. În procesul catalitic, la formarea complexului enzimă-substrat, enzima recunoaște conformația structurală a întregii molecule de substrat, a unei grupări funcționale din aceasta sau o anumită legătură chimică ce urmează a fi scindată. Acest tip de specificitate este condiționată de complementaritatea structurală (spațială și/sau electronică) dintre molecula substratului și a centrului activ al enzimei.

În funcție de mecanismul de formare a complexului enzimă-substrat, acest tip de specificitate poate fi de mai multe feluri: specificitate absolută de substrat, specificitate relativă de substrat, stereospecificitate etc.

a) ***Specificitatea absolută de substrat*** este întâlnită la acele enzime ce sunt capabile să recunoască structura chimică a unei singure specii moleculare, aceasta reprezentând unicul substrat. De exemplu, ***ureaza*** prezintă o specificitate absolută de substrat, catalizând reacția de scindare a ureei:

BUAŞM CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY



Ureaza este însă total inactivă față de alte substanțe asemănătoare structural cu ureea, sau chiar față de derivații ureei. Cercetări recente atestă faptul că ureaza ar putea totuși cataliza și alte transformări, aceste aspecte nefiind însă complet elucidate.

Există un număr relativ mare de enzime implicate în reacții bimoleculare care prezintă specificitate absolută față de un singur substrat sau față de ambele substrate. Există, de asemenea, enzime care prezintă grade diferite de specificitate în funcție de sursa biologică din care au fost izolate.

b) ***Specificitatea relativă de substrat*** se întâlnește atunci când enzima manifestă specificitate față de o anumită grupă funcțională din molecula substratului, sau față de anumite legături chimice din structura acestuia, fiind indiferentă față de restul moleculei.

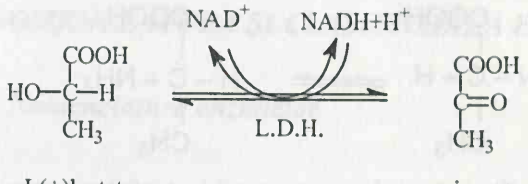
Un exemplu elocvent în acest sens îl reprezintă *fosfomonoesterazele*. Aceste enzime recunosc legătura fosfoesterică, catalizând hidroliza esterilor acidului ortofosforic cu alcoolii primari, secundari și ciclici, precum și unii fosfoesteri ai glucidelor, mononucleotidelor ș. a.

c) ***Stereospecificitatea*** enzimelor se referă la capacitatea acestora de a recunoaște un anumit izomer geometric sau optic. Acest tip de specificitate este foarte des întâlnit, dat fiind faptul că majoritatea compușilor bioorganici conțin atomi de carbon asimetrici, putând deci exista sub forma celor doi antipozi optici.

Cu mici excepții, enzimele recunosc doar unul din cei doi enantiomeri. Așa se explică faptul că în organismele vii se întâlnesc cu precădere monozaharidele aparținând seriei D și respectiv L-aminoacizii.

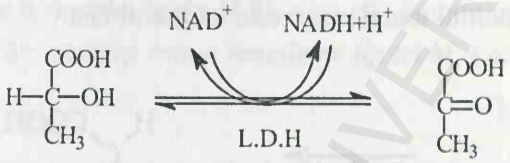
Există situații când o anumită enzimă izolată dintr-o sursă biologică este activă față de un anumit izomer optic, iar aceeași enzimă izolată din altă sursă recunoaște antipodul optic al acestuia. De exemplu *lactat-dehidrogenaza* din mușchi este activă față de izomerul levogir al acidului lactic:

BCU IAȘI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY



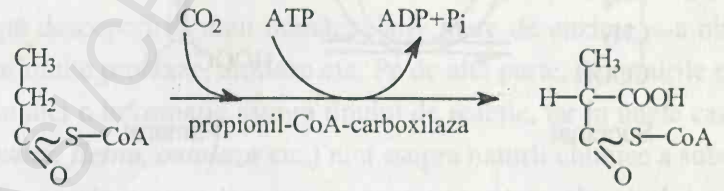
L(+)lactat piruvat

Aceeaşi enzimă izolată din *Lactobacillus plantarum* catalizează oxidarea acidului D(+)-lactic:



D(+)lactat piruvat

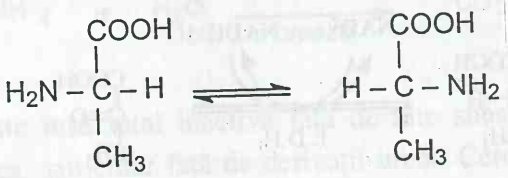
Stereospecificitatea se manifestă şi în reacţiile în care substratul are o moleculă simetrică, iar produsul transformării conţine atomi de carbon chirali. În asemenea cazuri se realizează aşa numita ***sinteză asimetrică***, adică se formează întotdeauna un singur izomer optic şi nu amestecul racemic cum se întâmplă în sinteza chimică organică. De exemplu, prin carboxilarea propionil-CoA, care este o substanţă optic inactivă, se formează întotdeauna metil-malonil-CoA optic activă:



propionil-CoA metil-malonil-CoA

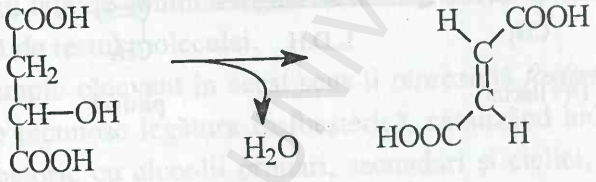
O clasă specială de enzime o constituie racemazele care acţionează asupra ambilor enantiomeri cu formare de amestecuri racemice. De exemplu alanin-racemaza poate acţiona atât asupra L(+)-alaninei cât şi D(-)-alaninei formând amestecul racemic D,L-alanină:

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY



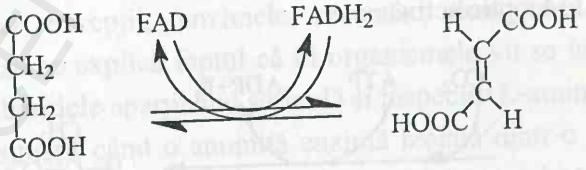
L (+) alaninã L (–) alaninã

Acelaşi tip de specificitate poate fi manifestat şi faţă de izomerii geometrici când o anumită enzimă este activă faţă de izomerul trans al substratului şi total indiferentă faţă de izomerul cis sau invers. De exemplu, în urma acţiunii fumarat-hidratazei asupra acidului malic se formează întotdeauna acidul fumaric şi nu acidul maleic care este izomerul cis:



malat fumarat

Tot izomerul trans se formează şi prin reacţia de dehidrogenare a acidului succinic sub acţiunea ***succinat-dehidrogenazei***:



Succinat Fumarat

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

II.2 NOMENCLATURA ŞI CLASIFICAREA ENZIMELOR

II.2.1 Nomenclatura enzimelor

Din punct de vedere chimic, enzimele pot cataliza reacţii cu un singur substrat, respectiv cu două sau chiar mai multe substrate. Nomenclatura generală a reacţiilor enzimatice a fost concepută pentru a descrie un număr de substrate şi produşi implicaţi în reacţiile enzimatice, utilizând prefixele latine *uni, bi, tri* ş.a.m.d. cu referire la una, două, trei sau mai multe specii moleculare. De exemplu, o reacţie care utilizează două substrate pentru a produce doi produşi este o ***reacţie de tip bi bi***, o reacţie la care participă trei substrate pentru a forma doi produşi este o ***reacţie de tip tri bi***, ş.a.m.d. (tabelul I).

Tabelul I

Tipuri de reacţii enzimatice în funcţie de numărul de substrate şi produşi de reacţie

Schema reacţiei	Tipul reacţiei
$S \longrightarrow P$	Uni uni
$S_1 + S_2 \longrightarrow P$	Bi uni
$S_1 + S_2 \longrightarrow P_1 + P_2$	Bi bi
$S_1 + S_2 + S_3 \longrightarrow P_1 + P_2$	Tri bi

Primele enzime descoperite au fost denumite după criterii întâmplătoare, fiind utilizată, cel mai adesea, adăugarea sufixului ***aza*** la numele substratului a cărei transformare o catalizează (***ureaza, amilaza, proteaza*** etc.). După descoperirea unui număr relativ mare de enzime, s-a observat că există mai multe proteaze, amilaze etc. Pe de altă parte, denumirile respective nu dădeau nici o informaţie asupra tipului de reacţie, iar în unele cazuri (***tripsina, pepsina, ficina, catalaza*** etc.) nici asupra naturii chimice a substratului.

Din aceste motive s-a impus ca o necesitate obiectivă introducerea unui nou tip de nomenclatură a enzimelor. Acest lucru a fost realizat prima dată în 1964 când ***Comisia de Enzimologie*** a ***Uniunii Internaţionale de Biochimie*** (***IUB***) elaborează normele ce stau la baza nomenclaturii şi clasificării enzimelor. Conform acestor norme denumirea enzimelor trebuie să reflecte numele substratului supus transformării sau numele produsului de reacţie şi

tipul de reacție catalizat de fiecare enzimă în parte, urmate de sufixul „*aza*". De exemplu ***catalaza*** are denumirea sistemică H_2O_2:H_2O_2-*oxidoreductaza* ceea ce înseamnă că substratul reacției este apa oxigenată care suferă o reacție de oxidoreducere, o moleculă de substrat reprezentând donorul, iar cealaltă acceptorul de electroni. În mod similar ***celulaza*** are denumirea sistemică *β-1,4-glucan-glucanohidrolaza*, iar ***invertaza*** sau ***zaharaza*** se numește *β-fructofuranozid-fructohidrolaza.*

Pentru unele enzime se pot utiliza și denumirile triviale atunci când acestea au intrat deja în uz, iar modificarea lor ar genera confuzii (***tripsina, pepsina, renina*** etc.).

Denumirile uzuale se mai folosesc și atunci când denumirile sistemice sunt prea lungi, iar utilizarea repetată a acestora ar fi deranjantă din punct de vedere stilistic. În asemenea cazuri însă trebuie menționată cel puțin odată denumirea științifică însoțită de codul numeric al enzimei după care se poate folosi denumirea trivială.

II.2.2 Nomenclatura precursorilor enzimatici

Multe enzime sunt sintetizate în organismele vii sub forma unor precursori inactivi pentru care IUB a propus denumirea de ***preenzime***, fiind însă des utilizate și denumirile de ***proenzime***, respectiv ***zimogene***. În funcție de locul de acțiune, acestea pot fi transportate prin diferite mecanisme la țesutul sau organul unde vor acționa, aici fiind transformate în enzime active din punct de vedere catalitic. De regulă, această activare are loc prin clivarea unui fragment din molecula zimogenului, fragment ce blochează activitatea proenzimei.

Sensul biologic al biosintezei unor enzime sub forma zimogenelor lor poate fi diferit. Pe de o parte, este posibil ca aceste forme inactive să reprezinte una din modalitățile de stopare a unor transformări biochimice atunci când necesitățile metabolice o cer, iar pe de altă parte este împiedicată acțiunea enzimelor asupra constituenților celulari ai țesutului sau organului care le-a sintetizat, așa cum se întâmplă în cazul proteinazelor digestive.

În funcție de denumirea enzimei active, nomenclatura zimogenelor se face prin adăugarea prefixelor ***pre-*** sau ***pro-***, respectiv a sufixului ***-ogen*** la numele enzimei ce ia naștere prin activarea zimogenului respectiv: ***pepsinogen, tripsinogen, procarboxipeptidaza, prorenină*** etc.

BCU IAȘI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

II.2.3 Clasificarea enzimelor

Odată cu creşterea numărului de enzime descoperite şi studiate sub aspectele structurii lor chimice şi mecanismului reacţiei catalizate, a apărut necesitatea unei clasificări ştiinţifice a acestora. Astăzi este valabilă clasificarea propusă în 1964 de către ***Comisia de Enzimologie*** a ***Uniunii Internaţionale de Biochimie*** care are la bază tipul şi mecanismul reacţiei catalizate (fig. 2).

Conform acestui criteriu, enzimele cunoscute până în prezent se clasifică în şase clase principale, enzimele cuprinse într-o clasă catalizând acelaşi tip de reacţie:

1) ***oxidoreductazele*** - enzime ce catalizează reacţiile de oxidoreducere ce au loc în organismele vii;

2) ***transferazele*** - enzime ce catalizează reacţii de transfer ale unor grupe de atomi ce pot fi şi grupe funcţionale de la un substrat la altul, fără ca aceste grupări să existe libere în timpul procesului;

3) ***hidrolazele*** - enzime ce catalizează scindarea diferitelor legături covalente din molecula substratului cu participarea moleculelor de apă;

4) ***liazele*** - enzime ce catalizează reacţii de adiţie a unor grupe de atomi la molecula substratului sau clivarea acestor grupări cu rearanjarea ulterioară a valenţelor;

5) ***izomerazele*** - enzime care catalizează diferite reacţii de izomerizare a substratelor;

6) ***ligazele*** sau ***sintetazele*** - enzime ce catalizează formarea unor noi legături chimice carbon – carbon sau carbon – heteroatom, în majoritatea cazurilor utilizându-se energia stocată în legăturile macroergice ale moleculelor de ATP.

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

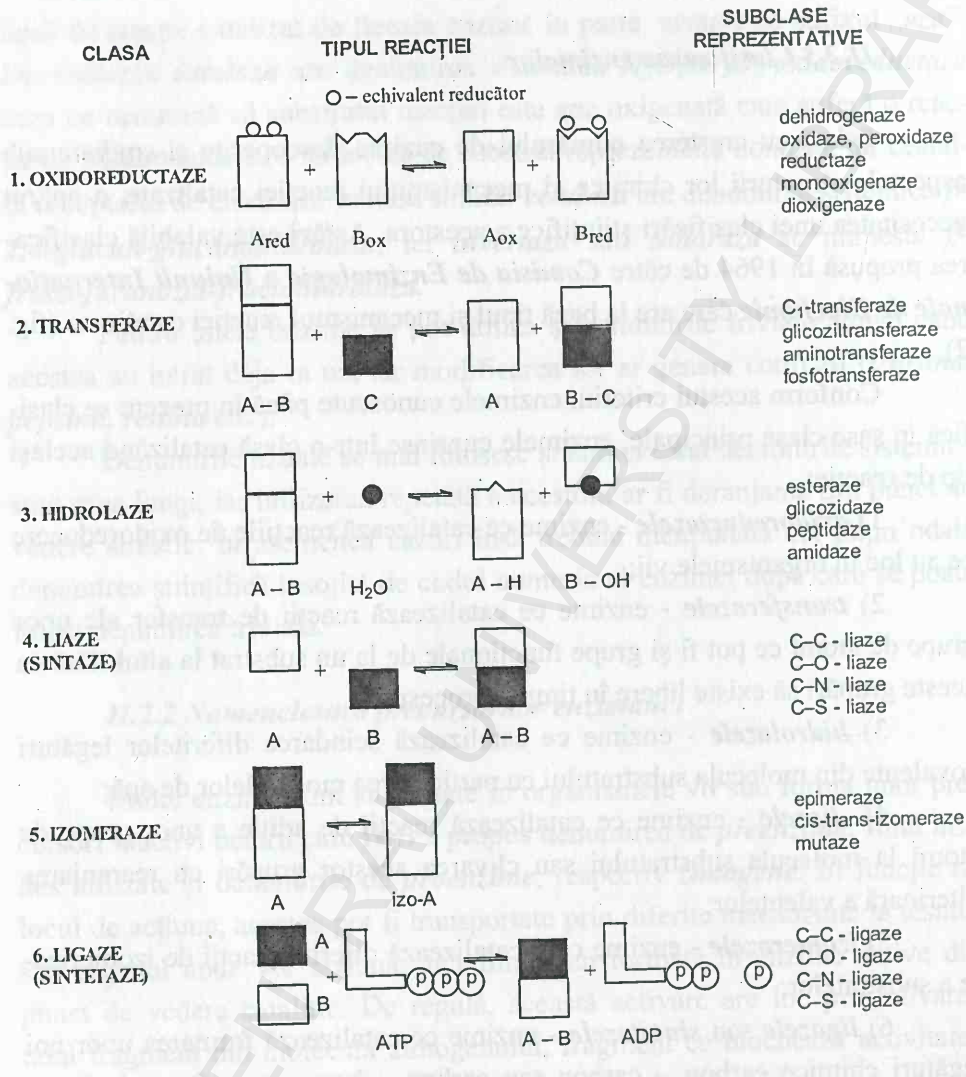


Fig. 2. Clasificarea enzimelor în funcție de tipul reacției catalizate și mecanismele generale de acțiune (Koolman, J. et al. – 2005)

La rândul lor enzimele din fiecare clasă se împart în subclase și subsubclase, în funcție de mecanismul de reacție, natura cofactorului, tipul de legătură chimică din substrat asupra căreia acționează etc. În cadrul fiecărei subsubclase, enzimele sunt aranjate într-o anumită ordine, în special cronologică (tabelul II).

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Tabelul II

Clasificarea enzimelor conform IUB 1964

1.Oxidoreductaze

1.1 Enzime ce acționează asupra grupărilor -CH_2-OH ca donor de hidrogen

1.1.1 Cu NAD^+ sau $NADP^+$ ca acceptor de hidrogen

1.1.2 Cu un citocrom ca acceptor de electroni

.....

1.1.99 Cu alți acceptori

1.2 Enzime ce acționează asupra grupărilor carbonil din aldehide sau cetone ca donor de hidrogen

1.2.1 Cu NAD^+ sau $NADP^+$ ca acceptor de hidrogen

1.2.2 Cu un citocrom ca acceptor de electroni

.....

1.2.99 Cu alți acceptori

1.3 Enzime ce acționează asupra grupărilor >CH-CH< ca donori de hidrogen

1.3.1 Cu NAD^+ sau $NADP^+$ ca acceptor de hidrogen

1.3.2 Cu un citocrom ca acceptor de electroni

.....

1.3.99 Cu alți acceptori

1.4 Enzime ce acționează asupra grupărilor >CH-NH_2 ca donori de hidrogen

1.4.1 Cu NAD^+ sau $NADP^+$ ca acceptor de hidrogen

1.4.2 Cu un citocrom ca acceptor de electroni

.....

1.4.99 Cu alți acceptori

1.5 Enzime ce acționează asupra grupărilor >CH-NH- ca donori de hidrogen

1.5.1 Cu NAD^+ sau $NADP^+$ ca acceptor de hidrogen

1.5.2 Cu un citocrom ca acceptor de electroni

.....

1.5.99 Cu alți acceptori

1.6 Enzime ce acționează asupra NADH sau NADPH ca donori de hidrogen

1.6.1 Cu NAD^+ sau $NADP^+$ ca acceptor de hidrogen

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

1.6.2 Cu un citocrom ca acceptor de electroni

.....

1.6.99 Cu alţi acceptori

1.7 Enzime ce acţionează asupra altor compuşi cu azot ca donori de hidrogen

1.7.2 Cu un citocrom ca acceptor de electroni

1.7.3 Cu oxigen ca acceptor de hidrogen sau electroni

.....

1.4.99 Cu alţi acceptori

1.8 Enzime ce acţionează asupra unor grupări cu sulf ca donori de hidrogen

1.8.1 Cu NAD^+ sau $NADP^+$ ca acceptor de hidrogen

1.8.2 Cu un citocrom ca acceptor de electroni

.....

1.8.99 Cu alţi acceptori

1.9 Enzime ce acţionează asupra unei grupări hemice ca donor de hidrogen

1.9.3 Cu oxigen ca acceptor de electroni sau hidrogen

1.9.6 Cu un compus cu azot ca acceptor de hidrogen

.....

1.9.99 Cu alţi acceptori

1.10 Enzime ce acţionează asupra difenolilor sau compuşilor înrudiţi cu el ca donori de hidrogen

1.10.2 Cu un citocrom ca acceptor de electroni

1.10.3 Cu oxigenul ca acceptor de electroni şi de hidrogen

1.11 Enzime ce acţionează asupra peroxidului de hidrogen ca donor de hidrogen

1.12 Enzime ce acţionează asupra hidrogenului ca donor

1.12.1 Cu NAD^+ sau $NADP^+$ ca acceptori de hidrogen

1.12.2 Cu un citocrom ca acceptor de electroni

.....

1.12.7 Cu fier-sulf proteină ca acceptor de hidrogen

1.13 Enzime ce acţionează asupra unui singur donor cu încorporarea oxigenului molecular (oxigenaze)

1.13.11 Cu încorporarea a doi atomi de oxigen

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

1.13.12 Cu incorporarea unui atom de oxigen (monooxigenaze interne sau oxidaze interne cu funcţie mixtă)

.....

1.13.99 Diverse (necesită caracterizări ulterioare)

1.14 Enzime ce acţionează asupra unei perechi de donori cu incorporarea oxigenului molecular

1.14.11 Cu α-cetoglutarat ca donor şi încorporarea fiecărui atom în fiecare donor

1.14.12 Cu NADH sau NADPH ca donori şi încorporarea a doi atomi de oxigen într-un singur donor

.....

1.14.99 Diverse (necesită caracterizări ulterioare)

1.15 Enzime ce acţionează asupra radicalilor superoxid ca acceptori

1.16 Enzime ce oxidează ioni metalici

1.16.3 Cu oxigen ca acceptor

1.17 Enzime ce acţionează asupra grupărilor -CH_2-

1.17.1 Cu NAD^+ sau $NADP^+$ ca acceptori

1.17.4 Cu un compus disulfidic ca acceptor

2. Transferaze

2.1 Enzime ce transferă grupări cu un atom de carbon

2.1.1 Metiltransferaze

2.1.2 Hidroximetil-, formiltransferaze şi transferaze ale unor compuşi înrudiţi

2.1.3 Carboxil- şi carbamoiltransferaze

2.1.4 Amidinotransferaze

2.2 Enzime ce transferă resturi de aldehide sau cetone

2.3 Aciltransferaze

2.3.1 Aciltransferaze

2.3.2 Aminoaciltransferaze

2.4 Glicoziltransferaze

2.4.1 Hexoziltransferaze

2.4.2 Pentoziltransferaze

.....

2.4.9 Transferaze pentru alte grupări glicozil

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

2.5 Enzime ce transferă grupări alchil (altele decât metil) şi grupări aril

2.6 Enzime ce transferă grupări cu azot

2.6.1 Aminotransferaze

2.6.3 Oximinotransferaze

2.7 Enzime ce transferă grupări ce conţin fosfor

2.7.1 Fosfotransferaze cu o grupare alcool ca acceptor

2.7.2 Fosfotransferaze cu o grupare carboxil ca acceptor

.....

2.7.9 Fosfotransferaze cu o pereche de acceptori

2.8 Enzime ce transferă grupări ce conţin sulf

2.8.1. Sulftransferaze

2.8.2 Sulfotransferaze

2.8.3 CoA transferaze

3. Hidrolaze

3.1 Enzime ce acţionează asupra legăturilor esterice

3.1.1 Ester carboxilic hidrolaze

3.1.2 Tioester hidrolaze

3.1.3 Fosfomonoester hidrolaze

3.1.4 Fosfodiester hidrolaze

3.1.5 Monoester trifosforic hidrolaze

3.1.6 Ester sulfuric hidrolaze

3.1.7 Monoester difosforic hidrolaze

3.2 Enzime ce acţionează asupra compuşilor glicozil

3.2.1 Hidrolizează compuşi O-glicozil

3.2.2 Hidrolizează compuşi N-glicozil

3.2.3 Hidrolizează compuşi S-glicozil

3.3 Enzime ce acţionează asupra legăturilor esterice

3.3.1 Tioester hidrolaze

3.3.2 Eter hidrolaze

3.4. Enzime ce acţionează asupra legăturilor peptidice

3.4.11 α-Aminoacilpeptid hidrolaze

3.4.12 Peptidilaminoacid sau acilaminoacid hidrolaze

.....

3.4.99 Proteinaze cu mecanism catalitic necunoscut

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

3.5 Enzime ce acționează asupra unor legături C-N, altele decât legăturile peptidice

3.5.1 în amide liniare

3.5.2 în amide ciclice

.....

3.5.99 în alți compuși

3.6 Enzime ce acționează asupra anhidridelor acide

3.6.1 în anhidride conținând grupare fosforil

3.6.2 în anhidride conținând grupare sulfonil

3.7 Enzime ce acționează asupra legăturilor C-C

3.7.1 în substanțe cetonice

3.8 Enzime ce acționează asupra halogen legăturilor

3.8.1 în compuși C-halogen

3.8.2 în compuși P-halogen

3.9 Enzime ce acționează asupra legăturilor P-N

3.10 Enzime ce acționează asupra legăturilor S-N

3.11 Enzime ce acționează asupra legăturilor C-P

4. Liaze

4.1 Carbon-carbon liaze

4.1.1 Carboxi-liaze

4.1.2 Aldehid-liaze

4.1.3 Cetoacid-liaze

.....

4.1.99 Alte C-C liaze

4.2 Carbon-oxigen liaze

4.2.1 Hidro-liaze

4.2.2 Acționează asupra polizaharidelor

.....

4.2.99 Alte C-O liaze

4.3 Carbon-azot liaze

4.3.1 Amoniac-liaze

4.3.2 Amidin-liaze

4.4 Carbon-sulf liaze

4.5 Carbon-halogen liaze

4.6 Fosfor-oxigen liaze

.....

4.99 Alte liaze

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

5. Izomeraze

5.1 Racemaze şi izomeraze

5.1.1 Acţionează asupra aminoacizilor şi derivaţilor lor

5.1.2 Acţionează asupra hidroxiacizilor şi derivaţilor lor

.....

5.1.99 Acţionează asupra altor compuşi

5.2 Cis-trans izomeraze

5.3 Oxidoreductaze intramoleculare

5.3.1 Intertransformă aldehidele şi cetonele

5.3.2 Intertransformă grupările ceto- şi enol

.....

5.3.99 Alte oxidoreductaze intramoleculare

5.4 Transferaze intramoleculare

5.4.1 Transferă grupări acil

5.4.2 Transferă grupări fosforil

5.4.3 Transferă grupări amino

.....

5.4.99 Transferă alte grupări

5.5 Liaze intramoleculare

5.99 Alte izomeraze

6. Ligaze (Sintetaze)

6.1 Enzime ce formează legături carbon-oxigen

6.1.1 Ligaze formând aminoacil-ARN$_t$ şi alţi compuşi înrudiţi

6.2 Enzime ce formează legături carbon-sulf

6.2.1 Acid-tio ligaze

6.3 Enzime ce formează legături carbon-azot

6.3.1 Acid-amoniac ligaze (amid sintetaze)

6.3.2 Acid-aminoacid ligaze (peptid sintetaze)

6.3.3 Ciclo-ligaze

6.3.4 Alte C-N ligaze

6.3.5 C-N ligaze cu glutamină ca amido-N-donor

6.4 Enzime ce formează legături carbon-carbon

6.5 Enzime ce formează legături esterice fosfat

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Conform acestei clasificări, fiecare enzimă este caracterizată nu numai de o denumire ci şi de un cod specific format din patru cifre: prima cifră reprezintă clasa, a doua subclasa, a treia cifră arată subsubclasa, iar ultima cifră a codului indică numărul de ordine din subsubclasa respectivă.

Acest cod este precedat de prescurtarea E.C. (***Enzyme Commission***). De exemplu, denumirea corectă şi completă a catalazei este ***H_2O_2: H_2O_2-oxidoreductaza*** (EC 1.11.1.6), iar cea a enzimei cu denumirea trivială dihidroorotaza este ***L-5,6-dihidroorotat-amidohidrolaza*** (EC 3.5.2.3).

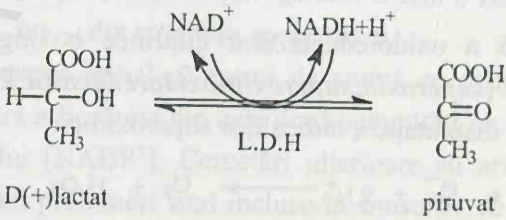
II.2.3.1 Caracterizarea clasei oxidoreductazelor

Din numărul total de enzime cunoscute până în prezent, aproximativ 25 % sunt enzime ce catalizează diferite reacţii de oxidare şi reducere biologică, aparţinând clasei oxidoreductazelor. Acestea sunt implicate, în principal, în procesele de oxidare biologică şi catalizează reacţii bimoleculare:

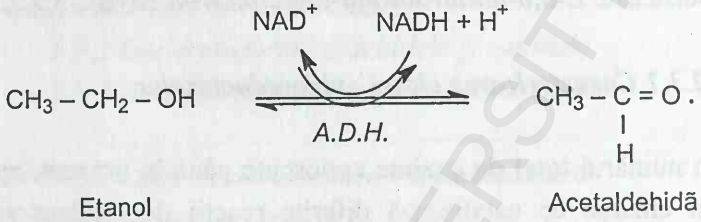
$$A_{ox} + B_{red} \rightleftharpoons A_{red} + B_{ox}$$

Denumirea sistemică a oxidoreductazelor se alcătuieşte prin includerea denumirii donorului şi acceptorului de hidrogen urmate de termenul oxidoreductaza ***(donor:acceptor-oxidoreductaza)***. Atunci când acceptorul de hidrogen este oxigenul, se foloseşte termenul de ***oxidază***. De exemplu, denumirea sistemică a alcooldehidrogenazei este ***alcool:NAD^+ - oxidoreductaza*** (EC 1.1.1.1), ***catalaza*** are denumirea sistemică ***H_2O_2:H_2O_2-oxidoreduc-taza*** (EC 1.11.1.6). În acelaşi timp, Uniunea Internaţională de Biochimie permite şi utilizarea aşa-numitelor denumiri de lucru prescurtate: ***alcooldehidrogenaza, malat - dehidrogenaza*** etc.

O enzimă importantă din această clasă este ***lactat - dehidrogenaza (L-lactat:NAD^+- oxidoreductaza*** EC 1.1.1.27) ce catalizează reacţia de conversie a acidului lactic în acid piruvic:



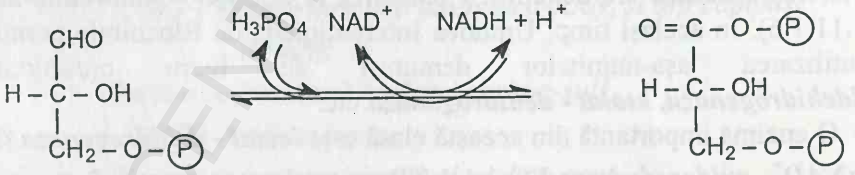
Această reacție este implicată în fermentațiile lactice precum și în procesul anaerob de degradare a glucidelor prin glicoliză. Determinarea activității acestei enzime în sânge este utilizată în practica medicală pentru diagnosticul infarctului de miocard, a hepatitei virale, a anemiei pernicioase etc. Un alt reprezentant al acestei clase este ***alcooldehidrogenaza*** (***alcool:NAD$^+$-oxidoreductaza*** EC 1.1.1.1) ce catalizează reacția reversibilă de oxidare a etanolului:



Etanol Acetaldehidă

Alcooldehidrogenaza joacă un rol important în procesele de fermentație alcoolică. În practica medicală această enzimă se utilizează la dozarea extrem de exactă a alcoolului etilic în sânge și urină.

În metabolismul glucidic acționează o enzimă cunoscută sub numele de ***gliceraldehidfosfat-dehidrogenază*** (***D-gliceraldehid-3-fosfat:NAD$^+$ - oxidoreductaza fosforilantă***) care manifestă o acțiune extrem de complexă în sensul că în afară de implicarea sa în procesul redox propriu-zis are și o acțiune secundară de fosforilare a substratului:



D-gliceraldehid-3-fosfat Acid 1,3-difosfogliceric

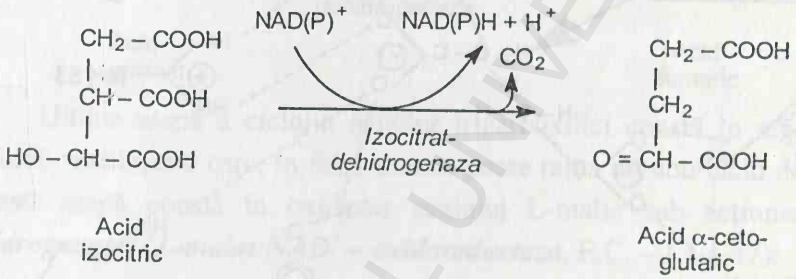
Subclasa 1.15 a oxidoreductazelor cuprinde o singură enzimă – ***superoxid-dismutaza*** (***superoxid:superoxid-oxidoreductaza*** EC 1.15.1.1) ce catalizează reacția de dismutație a radicalilor superoxidici:

$$O_2^- + O_2^- + 2H^+ \longrightarrow O_2 + H_2O_2$$

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Această enzimă este o metaloproteină cunoscută şi sub numele de ***eritrocupreină, hemocupreină*** sau ***citocupreină.***

Ciclul acizilor tricarboxilici reprezintă una din cele mai importante căi metabolice prin care se realizează oxidarea acetil – CoA la CO_2. Importanţa acestei secvenţe metabolice rezidă din faptul că acetil – CoA este un metabolit intermediar ce ocupă un loc central, atât în ceea ce priveşte procesele de degradare, cât şi cele de biosinteză. După formarea acidului izocitric are loc prima eliminare a unui atom de carbon sub formă de CO_2 când ***izocitrat dehidrogenaza (izocitrat:NAD$^+$ - oxidoreductaza decarboxilantă,*** EC 1.1.1.41 şi respectiv ***izocitrat:NADP$^+$ - oxidoreductaza decarboxilantă,*** EC 1.1.1.42) acţionează asupra acidului izocitric catalizând o reacţie complexă de dehidrogenare şi decarboxilare cu formare de acid α-cetoglutaric:



Enzima din *E. coli* este NADP$^+$– dependentă şi se prezintă sub forma unui dimer în care cele două subunităţi sunt identice şi au masele moleculare de câte 45 kDa. În condiţiile utilizării unui mediu nutritiv complex, izocitrat dehidrogenaza îşi îndeplineşte funcţiile sale oxidoreducătoare din ciclul Krebs. Dacă însă bacteria este cultivată pe acetat ca unică sursă de carbon, activitatea aceste enzime dispare, fiind induse în schimb alte enzime, în principal ***izocitrat liaza*** şi ***malat sintetaza.*** Aceste două enzime nu sunt implicate în ciclul acidului citric motiv pentru care ele scurtcircuitează această cale metabolică, intrând în aşa-numitul ciclu al glioxilatului. Atunci când *E. coli* se cultivă pe acetat, izocitrat dehidrogenaza suferă o reacţie de fosforilare la nivelul restului Ser_{113} din structura apoenzimei.

S-a presupus iniţial că restul de serină ce ocupă această poziţie în structura primară a fiecăreia din cele două subunităţi reprezintă locul de legare a cofactorului (NADP$^+$). Cercetări ulterioare au arătat însă că resturile Ser_{113} din cei doi protomeri sunt incluse în situsurile de legare a substratului (izocitratul) şi sunt localizate în centrul activ al enzimei.

Fosforilarea restului Ser_{113} conduce la inactivarea enzimei. Mecanismul inactivării a fost clarificat odată cu elucidarea modului de legare a izocitratului la nivelul centrului de legare din apoenzimă (fig. 3).

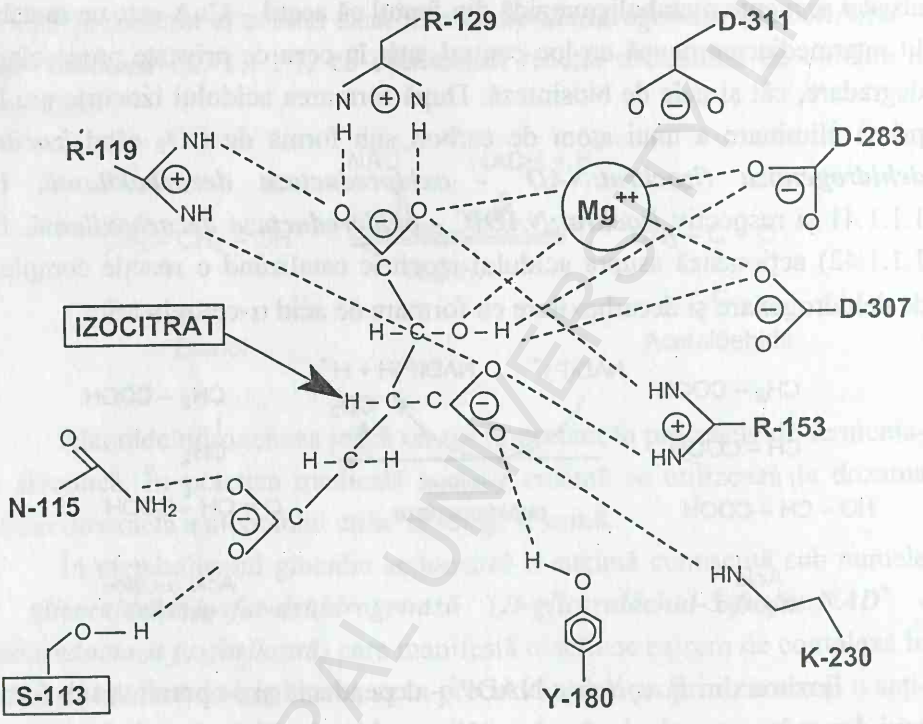


Fig.3. Reprezentarea schematică a legării acidului izocitric la nivelul centrului activ al izocitrat dehidrogenazei (indicii scrişi cu litere groase reprezintă resturile de aminoacizi din centrul activ aparţinând diferitelor catene polipeptidice) (Pelmont, J. – 1995)

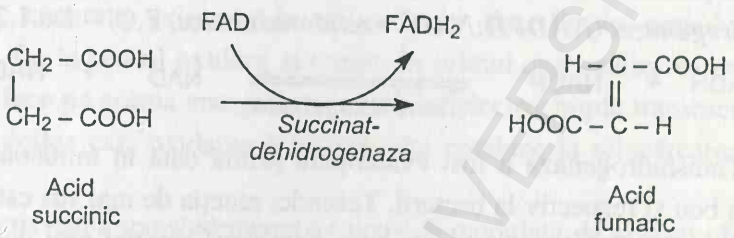
Molecula substratului se leagă printr-o multitudine de punţi de hidrogen la nivelul centrului activ al enzimei care este localizat între cele două subunităţi complexând, în acelaşi timp, un ion de magneziu. Spre deosebire de alte enzime ce pot fi fosforilate, în cazul izocitrat dehidrogenazei fosforilarea restului Ser_{113} conduce la o modificare conformaţională suficient de puternică încât să inactiveze enzima.

În acelaşi timp, substituirea restului de Ser_{113} cu un rest de alanină, treonină, cisteină sau lizină conduce la o diminuare drastică a activităţii izocitrat dehidrogenazei fără ca aceasta să fie complet anulată, în timp ce

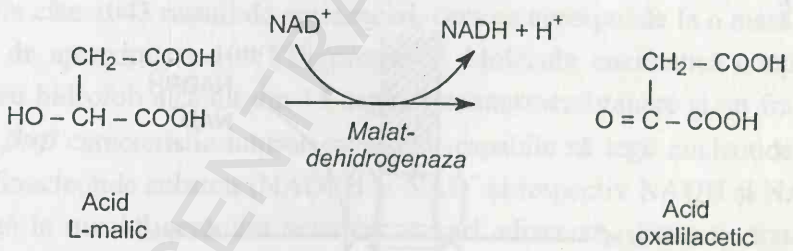
BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

înlocuirea Ser_{113} cu acid aspartic sau glutamic determină o inactivare completă a enzimei.

Succinat dehidrogenaza (***succinat:acceptor–oxidoreductaza***, EC 1.3.99.1) este o altă oxidoreductază importantă implicată în ciclul Krebs. Ea este o flavoproteină ce conține fier și sulf, iar în ciclul acizilor tricarboxilici catalizează reacția de dehidrogenare a acidului succinic cu formare de acid fumaric. Are loc deci dehidrogenarea substratului cu apariția unei legături duble C=C de tip *trans*:



Ultima etapă a ciclului acizilor tricarboxilici constă în regenerarea acidului oxalilacetic care, în felul acesta, poate relua un nou ciclu de reacții. Această etapă constă în oxidarea acidului L-malic sub acțiunea ***malat dehidrogenazei*** (***L-malat:NAD$^+$ – oxidoreductaza***, E.C. – 1.1.1.37):



Malat dehidrogenaza formează împreună cu citrat sintetaza un complex labil la suprafața internă a membranei mitocondriale, de care se leagă. În același mod este asociată cu membrana mitocondrială și piruvat carboxilaza. Această localizare a enzimelor enumerate mai sus se explică prin faptul că oxaloacetatul se poate forma atât în urma dehidrogenării malatului cât și prin carboxilarea piruvatului. Aceasta înseamnă că ciclul Krebs, ce debutează prin reacția de condensare dintre oxaloacetat și acetil-CoA, poate utiliza atât aci-

BCU IAȘI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

dul oxalilacetic regenerat în urma desfăşurării ciclului anterior de reacţii cât şi cel format prin carboxilarea piruvatului.

Este cunoscut faptul că marea majoritate a oxidoreductazelor cunoscute în prezent sunt fie $NAD(P)^+$ – dependente, fie FMN (FAD) – dependente. Formele reduse ale celor patru coenzime pot fi regenerate sub forma lor oxidată într-o multitudine de reacţii enzimatice. Un debuşeu important pentru hidrogenul coenzimelor reduse îl constituie catena respiratorie (fosforilarea oxidativă) ce realizează oxidarea hidrogenului cu formare de apă. Cele două coenzime piridin-nucleotidice pot participa la o reacţie redox datorită acţiunii ***transhidrogenazei*** (***NADPH:NAD$^+$ – oxidoreductaza***, E.C. – 1.6.1.2):

$$NADH + NADP^+ \underset{\text{Transhidrogenaza}}{\rightleftharpoons} NAD^+ + NADPH$$

Transhidrogenaza a fost evidenţiată prima dată în mitocondriile din inima de bou şi respectiv la bacterii. Teoretic, reacţia de mai sus este reversibilă. În condiţii fiziologic normale însă, echilibrul reacţiei este deplasat puternic spre dreapta întrucât caracterul reducător al NADPH este mult mai mare decât puterea reducătoare a NADH-ului. Sursa de energie necesară realizării acestui proces nu este ATP-ul ci potenţialul de membrană. Fiecare ciclu de transhidrogenare este cuplat cu un flux transmembranar de protoni (fig. 4).

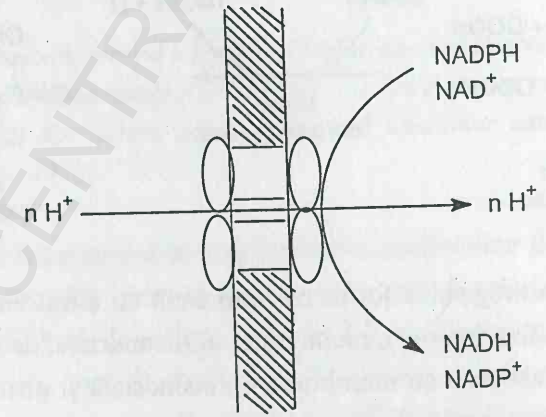


Fig. 4. Reprezentarea schematică a mecanismului de acţiune al transhidrogenazei (Yamaguchi, M. et al. – 1988)

BCU IAŞI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Protonii tind să traverseze într-un singur sens membrana dinspre suprafața la nivelul căreia se înregistrează un surplus de sarcini pozitive. Forța exercitată asupra protonilor de diferența de potențial de o parte și de cealaltă a membranei reprezintă sursa energetică ce face ca reacția catalizată de transhidrogenază să decurgă în sens contrar sensului termodinamic normal. Dată fiind cuplarea acestei reacții cu transportul transmembranar al protonilor, transhidrogenaza poate fi definită ca ***pompă de protoni.***

Cercetări recente au demonstrat faptul că echilibrul reacției catalizate de transhidrogenază poate fi totuși deplasat într-un sens sau altul în funcție de condițiile concrete existente la un moment dat, fie în sensul formării NADPH, fie în sensul oxidării acestuia. În primul caz, realizarea procesului redox se face pe seama energiei potențialului electrochimic transmembranar, iar în al doilea caz, oxidarea NADPH–ului conduce la reîncărcarea acestui potențial.

Activitatea transhidrogenazei poate fi modulată de aceiași efectori ce acționează și asupra ATP-azei membranare. Astfel, ea este inhibată în mod specific de către N,N'-diciclohexil-carbodiimidă (DCCD) și p-fluorosulfonil-benzoil-5-adenozină (FBSA). Molecula transhidrogenazei mitocondriale este înglobată în structura membranei interne, sub formă dimeră. În cazul enzimei din mușchiul cardiac de bou, cele două subunități sunt identice și conțin câte 1043 resturi de aminoacizi, ceea ce corespunde la o masă moleculară de aproximativ 109 kDa/protomer. Molecula enzimatică conține un domeniu hidrofob alcătuit din 14 segmente transmembranare și un fragment de tip $\beta\alpha\beta$ caracteristic tuturor enzimelor capabile să lege nucleotide. Cele două dinucleotide substrat (NADPH și NAD^+ și respectiv NADH și $NADP^+$) se leagă la nivelul centrului activ în situsuri adiacente, distincte, transferul hidrogenului făcându-se direct de la un substrat la altul.

Din punct de vedere structural există o evidentă analogie între transhidrogenaza bovină și cea din *E. coli.* Cu toate acestea, transhidrogenaza bacteriană are molecula formată din două subunități diferite, de tip α și β, care formează o structură cuaternară de forma $\alpha_2\beta_2$. Catenele de tip α traversează de patru ori membrana, iar catenele de tip β de opt ori, iar situsurile de legare a nucleotidelor sunt localizate între catenele α și β.

În marea majoritate a reacțiilor de oxidare și reducere catalizate dehidrogenazele NAD^+– și $NADP^+$– dependente se realizează transferul a

câte doi electroni. Există totuşi unele dehidrogenaze ce catalizează reacţii de oxidoreducere în care are loc transferul a câte patru electroni, ca şi cum enzimele respective ar cataliza două dehidrogenări succesive. Aşa se întâmplă de exemplu în cazul oxidării unei grupări alcoolice primare direct în grupare carboxilică. O astfel de enzimă este ***UDP-glucozo-dehidrogenaza*** (***UDP-glucoză:NAD$^+$ - 6 – oxidoreductaza***, EC 1.1.1.22), identificată iniţial în hepatocite. Ulterior s-a demonstrat că această enzimă este larg răspândită atât la microorganisme cât şi în ţesuturile animale şi vegetale.

Activitatea UDP-glucozo-dehidrogenazei este esenţială pentru formarea acidului UDP-glucuronic ce reprezintă la rândul său un precursor în biosinteza diferitelor polizaharide acide. Enzima din hepatocite este o proteină oligomeră cu structură cuaternară complexă, ce conţine şase subunităţi identice cu masele moleculare de câte 52 kDa. Oxidarea UDP-glucozei la UDP-glucuronat este însoţită de reducerea a doi moli de NAD$^+$ (fig. 5).

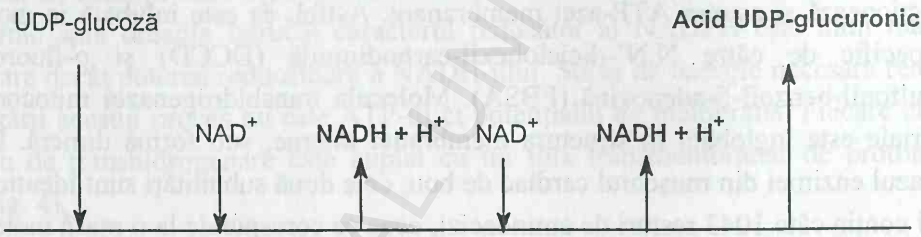


Fig.5. Reprezentarea schematică a formării acidului UDP-glucuronic sub acţiunea UDP-glucozo-dehidrogenazei (Pelmont, J. – 1995)

Din punct de vedere cinetic, în acţiunea UDP-glucozo-dehidrogenazei, se observă un efect de cooperativitate negativă. În procesul catalitic, fiecare moleculă de enzimă leagă trei molecule de substrat (deoarece la fiecare două subunităţi există câte un situs de legare) şi respectiv trei molecule ale cofactorului care joacă rol de cosubstrat.

Mecanismul de acţiune al enzimei prezintă unele particularităţi în sensul că cele două etape succesive ale oxidării substratului au loc fără ca acesta să părăsească complexul enzimă-substrat (fig. 6).

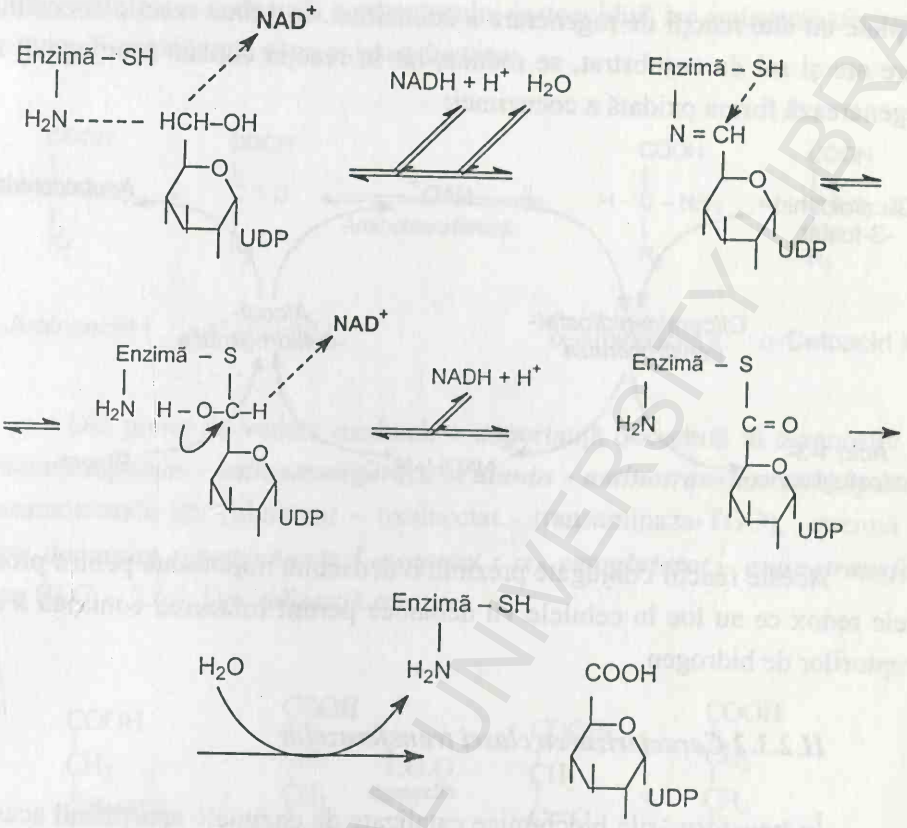


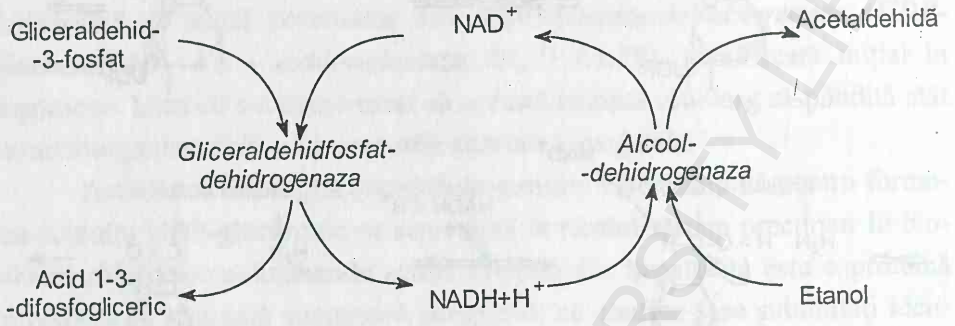
Fig 6. Mecanismul oxidării UDP-glucozei (Pelmont, J. – 1995)

UDP-glucoza este primul substrat care se leagă la nivelul centrului activ al enzimei, iar mecanismul de reacție este de tip „*Bi–Uni–Uni–Bi*". Experimentele efectuate prin utilizarea inhibitorilor specifici au demonstrat faptul că în timpul reacției, enzima formează două legături covalente la nivelul grupei ε-amino a unui rest de lizină și respectiv al grupei –SH a unui rest de cisteină. Inițial, gruparea $-CH_2 - OH$ aparținând restului de UDP-glucoză se oxidează la grupare aldehidică care formează o bază Schiff (aldimină) cu gruparea ε-amino a restului de lizină din centrul activ. Abia după aceea, gruparea –SH a unui rest de cisteină formează o legătură temporară de tip tioester, iar factorul limitant al reacției enzimatice, în ansamblu, îl reprezintă hidroliza finală a acestui tioester.

Reacțiile enzimatice catalizate de oxidoreductaze care posedă în calitate de coenzimă NAD^+ sau $NADP^+$ sunt de obicei reacții reversibile și sunt

BCU ARHIVA CENTRALĂ UNIVERSITY LIBRARY

cuplate cu alte reacții de regenerare a coenzimei. În prima reacție coenzima, care are și rol de cosubstrat, se reduce, iar în reacția cuplată (conjugată) se regenerează forma oxidată a coenzimei:



Aceste reacții conjugate prezintă o deosebită importanță pentru procesele redox ce au loc în celulele vii deoarece permit refacerea continuă a acceptorilor de hidrogen.

II.2.3.2 Caracterizarea clasei transferazelor

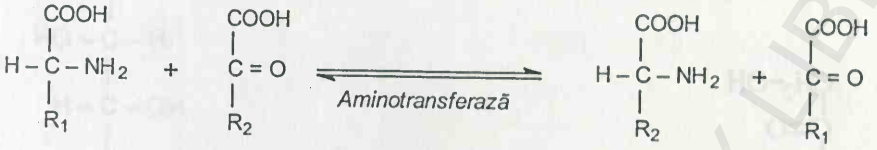
În transformările biochimice catalizate de enzimele aparținând acestei clase, are loc clivarea unei grupe de atomi R (ce poate fi și grupare funcțională) din structura substratului A-R și fixarea acesteia pe cel de-al doilea substrat:

$$A{-}R + B \underset{\text{transferază}}{\rightleftharpoons} A + B{-}R$$

Reacțiile catalizate de transferaze sunt prin urmare reacții bimoleculare, în care un substrat joacă rol de donor, iar celălalt rol de acceptor al grupării transferate. Din această cauză, denumirea sistemică a acestor enzime este de tipul ***donor:acceptor-transferaza.***

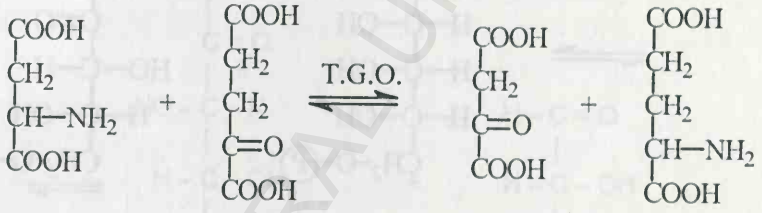
Dintre enzimele cunoscute până în prezent, aproximativ 30% sunt transferaze. Din această clasă de enzime fac parte, de exemplu ***aminotransferazele***, enzime ce catalizează reacția unui α-aminoacid cu un α-cetoacid, conducând la formarea unui nou aminoacid și a unui nou cetoacid. Din punctul de vedere al mecanismului de reacție, această transformare poate fi considerată ca fiind o dezaminare oxidativă a donorului (aminoacidul) cu-

plată cu aminarea reductivă a acceptorului (cetoacidul) iar aminotransferazele ar putea fi considerate şi ca oxidoreductaze:



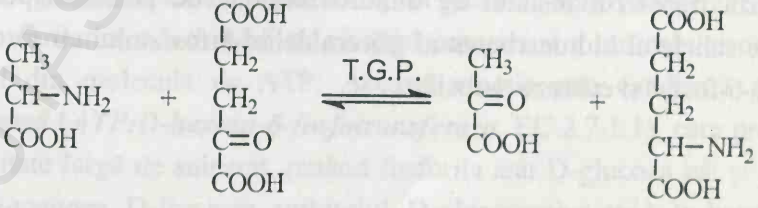
α-Aminoacid I α-Cetoacid I α-Aminoacid II α-Cetoacid II

Din punct de vedere medical, o importanță deosebită în diagnostic o prezintă ***aspartat - aminotransferaza*** şi ***alanin - aminotransferaza***. Aspartat - aminotransferaza (glutamat – oxalacetat - transaminaza-TGO), enzimă a cărei denumire sistemică este ***L-aspartat : α - cetoglutarat – aminotransferaza*** (E.C. – 2.6.1.1) catalizează reacția:



L-aspartat α-cetoglutarat oxaloacetat L-glutamat

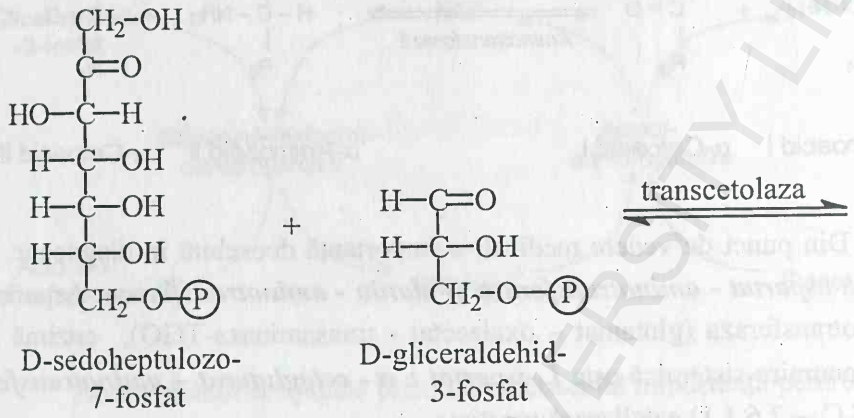
Transaminarea alaninei are loc sub acțiunea ***alanin-aminotransferazei*** (glutamat – piruvat – transaminaza - TGP) a cărei denumire sistemică este ***L – alanin - α - cetoglutarat - aminotransferaza*** (E.C. – 2.6.1.2):



L-alaninã α-cetoglutarat piruvat L-glutamat

BCU CASA CENTRALA UNIVERSITARA LIBRARY

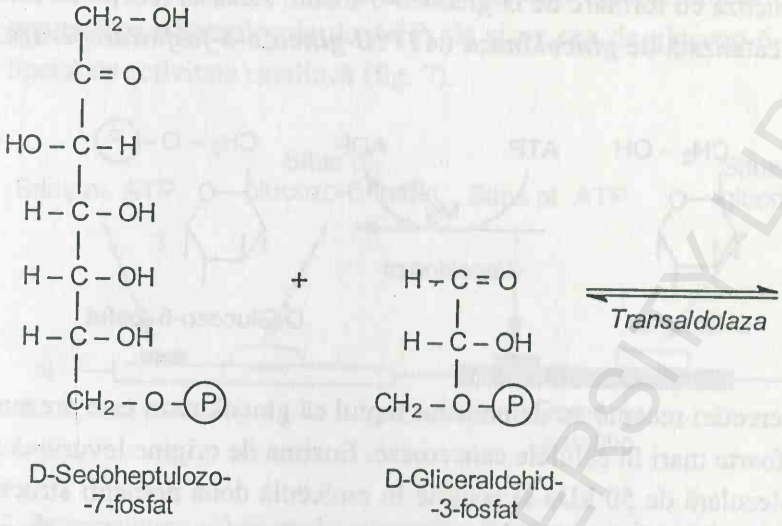
O transferază importantă implicată în metabolismul glucidic este ***transcetolaza***, a cărei denumire sistemică este ***sedoheptulozo-7-fosfat:D-gliceraldehid-3-fosfat-glicol-aldehid-transferaza*** (EC 2.2.1.1):



D-sedoheptulozo-7-fosfat + D-gliceraldehid-3-fosfat ⇌ D-ribozo-5-fosfat + D-xilulozo-5-fosfat

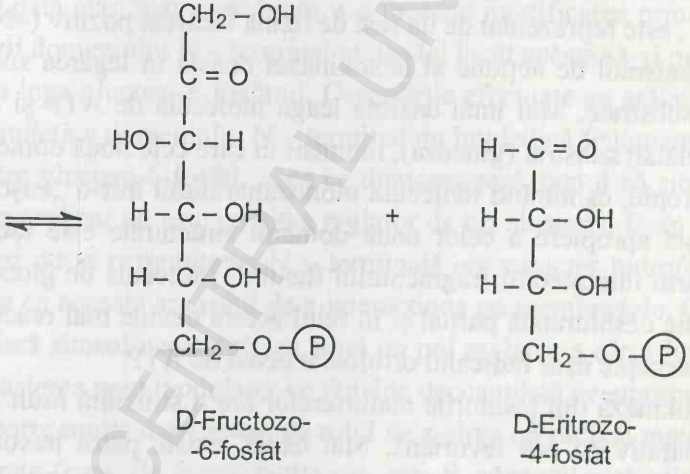
Gliceraldehid – 3 – fosfatul şi sedoheptulozo – 7 – fosfatul pot participa şi la o altă reacţie, aşa cum se întâmplă în ciclul pentozofosfaţilot, cale metabolică în care este implicată ***transaldolaza*** (***sedoheptulozo-7-fosfat : gliceraldehid – 3 – fosfat - gliceroltransferaza***, EC 2.2.1.2). Această enzimă catalizează transferul restului de dihidroxiacetonă de la sedoheptulozo-7-fosfat pe scheletul hidrocarbonat al gliceraldehid-3-fosfatului cu formare de fructozo-6-fosfat şi eritrozo-4-fosfat:

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY



D-Sedoheptulozo-
-7-fosfat

D-Gliceraldehid-
-3-fosfat



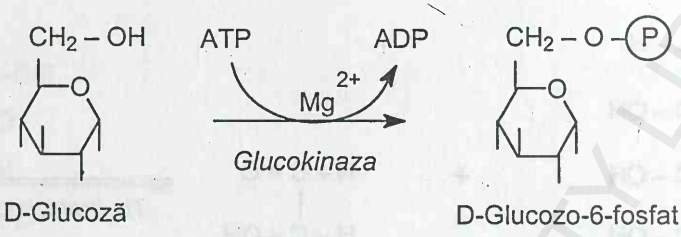
D-Fructozo-
-6-fosfat

D-Eritrozo-
-4-fosfat

Degradarea parțială a glucozei prin glicoliză anaerobă debutează odată cu fosforilarea substratului cu ajutorul energiei și a radicalului ortofosfat terminal din molecula de ATP. Această reacție este catalizată de către ***hexokinază*** (***ATP:D-hexozo-6-fosfotransferaza***, EC 2.7.1.1), care prezintă o specificitate largă de substrat, putând fosforila atât D-glucoza cât și alte hexoze (D-manoza, D-fructoza, sorbitolul, D-glucozamina etc.). În hepatocitele de șobolan a fost evidențiată o enzimă înalt specifică, capabilă să fosforileze

BCU "SVICENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

doar D-glucoza cu formare de D-glucozo-6-fosfat. Această reacție de esterificare este catalizată de ***glucokinază*** (***ATP:D-glucozo-6-fosfotransferaza***, EC 2.7.1.2):



Cercetări recente au demonstrat faptul că glucokinaza este prezentă în cantități foarte mari în celulele canceroase. Enzima de origine levuriană are o masă moleculară de 50 kDa şi conține în moleculă două domenii structurale localizate în zonele N– şi respectiv C–terminală, legate printr-un fragment flexibil, iar centrul activ este reprezentat de o concavitate localizată între cele două domenii. Situsul de legare a moleculei de ATP, sub forma complexului ATP – Mg^{2+}, este reprezentat de un rest de lizină încărcat pozitiv ($-NH_3^+$).

Mecanismul de acțiune al hexokinazei constă în legarea succesivă a celor două substrate. Mai întâi enzima leagă molecula de ATP şi abia apoi este legat celălalt substrat (glucoza), moment în care cele două domenii structurale se apropie, capturând molecula monozaharidului într-o „cuşcă" hidrofobă. Această apropiere a celor două domenii structurale este facilitată de rotirea lor prin intermediul fragmentului flexibil. Molecula de glucoză astfel înglobată este deshidratată parțial şi în felul acesta devine mai reactivă, fiind capabilă să accepte uşor radicalul ortofosfat cedat de ATP.

Hexokinaza din țesuturile mamiferelor are o structură mult mai complexă comparativ cu cea levuriană. Mai exact, există patru hexokinaze cu proprietăți şi localizări diferite. Astfel, masa moleculară a hexokinazelor I, II şi III este de aproximativ 100 kDa, adică dublă față de cea levuriană, iar în celulele canceroase se întâlneşte o a patra formă – hexokinaza IV – a cărei masă moleculară este de 50 kDa. În afară de aceasta, hexokinazele I, II şi III pot fi inhibate de către produsul de reacție (glucozo-6-fosfatul), în timp ce la hexokinaza IV nu se constată acest fenomen. Studiul inhibiției prin produsul de reacție a clarificat parțial unele aspecte ale mecanismului fosforilării glucozei, aspecte extrem de interesante care însă rămân deocamdată incomplet elucidate. S-a sugerat astfel că fenomenul de inhibiție are loc la nivelul do-

meniului structural din zona N–terminală. Această zonă a moleculei enzimatice recunoaşte atât molecula de ATP cât şi pe cea de glucozo-6-fosfat dar este lipsită de activitate catalitică (fig. 7).

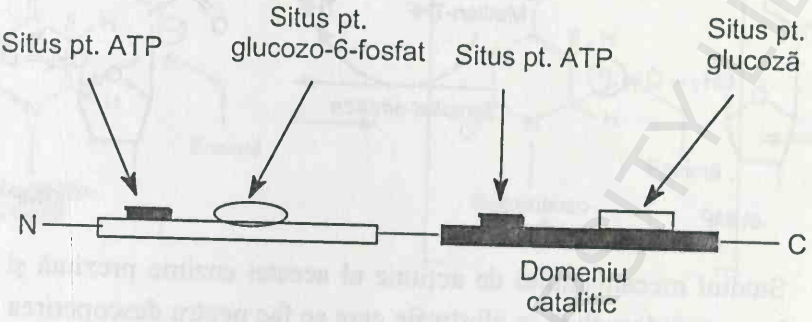
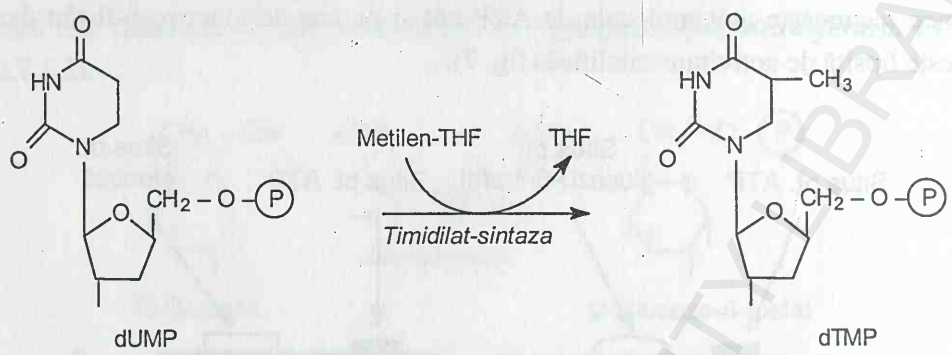


Fig. 7. Reprezentarea schematică a situsurilor de legare a substratelor şi inhibitorului din molecula hexokinazei (White, T. K. et al. – 1989)

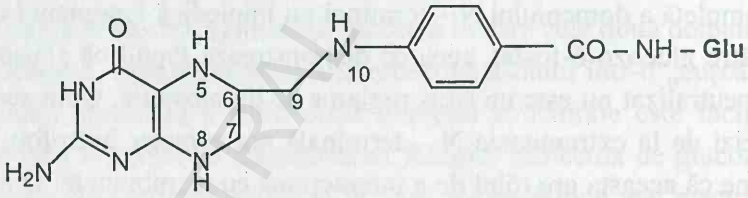
O dată clarificat acest lucru, s-a încercat modificarea prin mutageneză a structurii domeniului N – terminal în aşa fel încât acesta să-şi piardă capacitatea de a lega glucozo-6-fosfatul. Cercetările efectuate au arătat că neutralizarea completă a domeniului N – terminal nu împiedică fenomenul de inhibiţie de către glucozo-6-fosfat, ceea ce demonstrează faptul că situsul din domeniul neutralizat nu este un situs reglator de tip alosteric. Cum secvenţa de aminoacizi de la extremitatea N – terminală are caracter hidrofob, se poate presupune că aceasta are rolul de a interacţiona cu membranele. O altă ipoteză consideră situsul necatalitic ca fiind un pol reglator a cărui funcţie constă în recunoaşterea unui modulator ce rămâne deocamdată necunoscut.

Foarte multe transferaze au rolul de a cliva un radical metil de la unul din substrate (care, de foarte multe ori, este S–adenozil-metionina) şi de a-l grefa pe molecula celui de al doilea substrat. Aceste enzime alcătuiesc grupa ***metiltransferazelor*** (***transmetilaze***) şi sunt reunite în subclasa 2.1. Studiul metiltransferazelor prezintă un interes deosebit dat fiind faptul că reacţiile de transmetilare se întâlnesc în foarte multe secvenţe ale metabolismului intermediar. O enzimă extrem de importantă din această grupă este ***timidilat sintaza*** (***5,10 – metilentetrahidrofolat : dUMP – metiltransferaza***, EC 2.1.1.45) care joacă un rol deosebit în procesul de biosinteză a ADN-ului (mai exact a precursorilor necesari replicării ADN-ului):

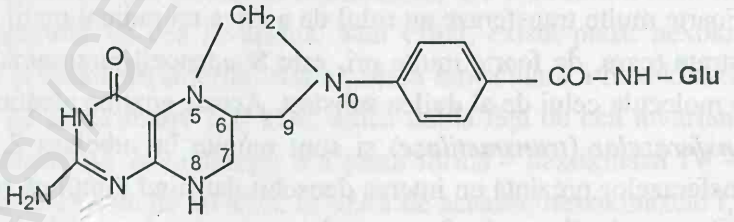


Studiul mecanismului de acțiune al acestei enzime prezintă și o importanță practică deosebită în eforturile care se fac pentru descoperirea de noi preparate farmaceutice antitumorale

Biosinteza timidilat sintazei se realizează printr-un mecanism interesant, în sensul că această proteină își modelează propria sa translație datorită capacității sale de a interacționa în mod specific cu ARN_t-ul său. Substratul natural este dUMP, iar donorul grupei metil este acidul N^5,N^{10}-metilen-tetrahidrofolic:



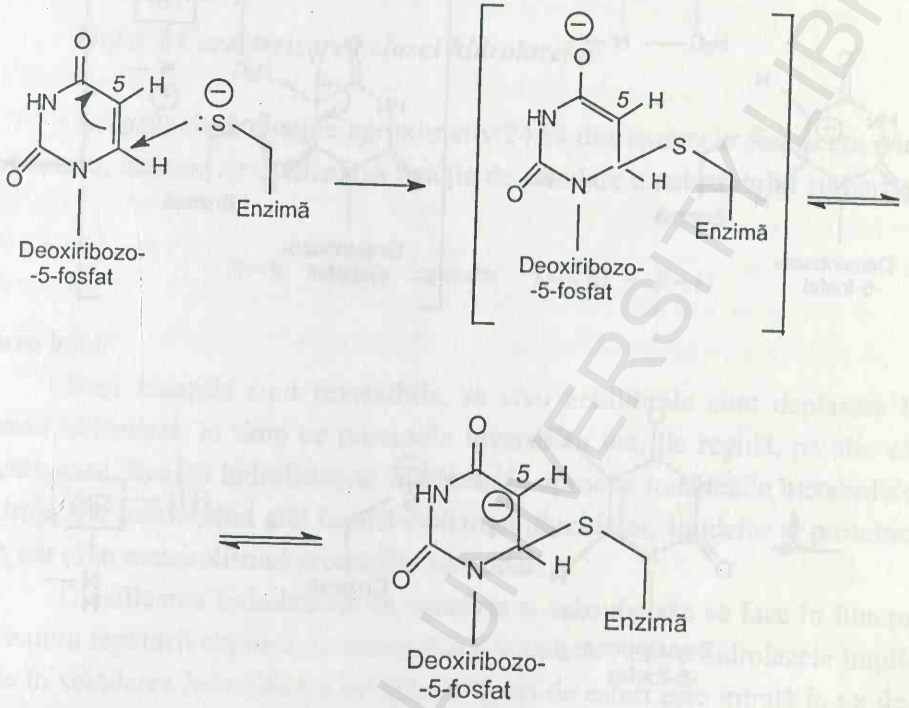
Acidul tetrahidrofolic (THF)



Acidul N^5,N^{10}-metilen-tetrahidrofolic (metilenTHF)

Se presupune că în desfășurarea reacției de transmetilare, un rol important îl joacă gruparea –SH liberă a unui rest de cisteină din structura apoenzimei care formează o legătură covalentă temporară cu substratul, la

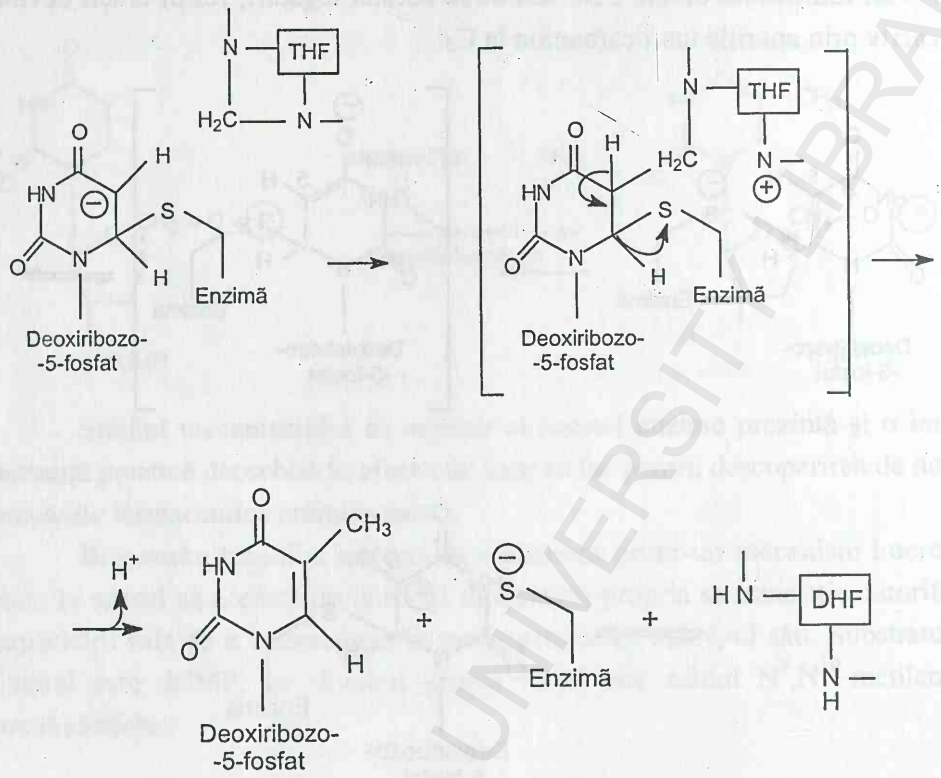
nivelul radicalului uracil. Prin stabilirea acestei legături, restul uracil devine reactiv prin apariția unui carbanion la C_5:



Etapa imediat următoare a acestei reacții constă în atacul metilen-tetrahidrofolatului în urma căruia se formează o nouă legătură covalentă temporară la nivelul atomului de carbon metilenic. Acesta are aceeași stare de oxidare pe care o are atomul de carbon din molecula formaldehidei (adică starea de oxidare zero) în timp ce carbonul metilic din restul de timină are starea de oxidare 2^- (fiind deci mai puțin oxidat).

Din această cauză, ultima etapă constă într-o rearanjare generală a valențelor care presupune un fenomen de oxido-reducere. Legătura cu cofactorul enzimatic se rupe, atomul de carbon transferat este transformat în carbon metilic, iar acidul tetrahidrofolic (THF) se oxidează cu formare de acid 7,8–dihidrofolic (DHF), cu apariția unei legături duble în poziția 7–8. În fine, ruperea legăturii covalente dintre produs și enzimă este însoțită de eliminarea unui proton:

BCU ASCENTRAL UNIVERSITY LIBRARY



Se consideră că apariția, în cursul acestei transformări, a intermediarului instabil explică acțiunea inhibitoare asupra timidilat sintazei a acidului 5-fluoro-deoxiuridilic (5F-dUMP) care este un analog structural al substratului. Atomul de fluor din acest compus substituie hidrogenul de la C_5 al dUMP. Acest analog structural parcurge întregul ciclu catalitic până la această etapă, neputând însă expulza fluorul sub forma cationului F^+. Aceasta înseamnă că timidilat sintaza este practic complet inhibată după legarea metilen-tetrahidrofolatului.

Metilarea restului de uracil cu formare de timină este o reacție unică în metabolismul celular. Acidul dihidrofolic rezultat (DHF) este apoi redus sub acțiunea ***dihidrofolat reductazei***, o enzimă NADPH – dependentă, iar acidul tetrahidrofolic format trece din nou în metilen-tetrahidrofolat prin utilizarea serinei în calitate de donor de grupe metilen. De aceea, timidilat sintaza și dihidrofolat reductaza reprezintă două enzime de a căror activitate depinde biosinteza *de novo* a timinei necesară replicării ADN-ului. Aceasta

înseamnă că aceste două enzime joacă un rol hotărâtor în dezvoltarea celulelor tumorale, precum şi în multiplicarea anumitor virusuri.

II.2.3.3 Caracterizarea clasei hidrolazelor

Această clasă conţine aproximativ 24 % din enzimele cunoscute până în prezent, enzime ce catalizează reacţia de scindare a substratului cu partici-

$$S{-}R + H_2O \rightleftharpoons S{-}OH + R{-}H$$

parea apei:

Deşi reacţiile sunt reversibile, *in vivo* echilibrele sunt deplasate în sensul hidrolizei, în timp ce procesele inverse au loc, de regulă, pe alte căi metabolice. Reacţii hidrolitice se întâlnesc în aproape toate căile metabolice, hidrolazele participând atât la metabolismul glucidelor, lipidelor şi proteinelor, cât şi în metabolismul produşilor secundari.

Clasificarea hidrolazelor în subclase şi subsubclase se face în funcţie de natura legăturii chimice ce urmează a fi scindată. Pentru hidrolazele implicate în scindarea hidrolitică a diferitelor tipuri de esteri este intrată în uz denumirea generică de ***esteraze.*** O esterază foarte cunoscută este ***lipaza*** a cărei denumire sistemică este ***triacilglicerol-acil-hidrolaza*** (EC 3.1.1.3) şi care este implicată în scindarea hidrolitică a triacilglicerolilor:

$$\begin{array}{l} CH_2{-}O{-}CO{-}R_1 \\ | \\ CH{-}O{-}CO{-}R_2 \\ | \\ CH_2{-}O{-}CO{-}R_3 \end{array} + 3\ H_2O \xrightarrow{\text{lipaza}} \begin{array}{l} CH_2{-}OH \\ | \\ CH{-}OH \\ | \\ CH_2{-}OH \end{array} + \begin{array}{l} R_1 - COOH \\ R_2 - COOH \\ R_3 - COOH \end{array}$$

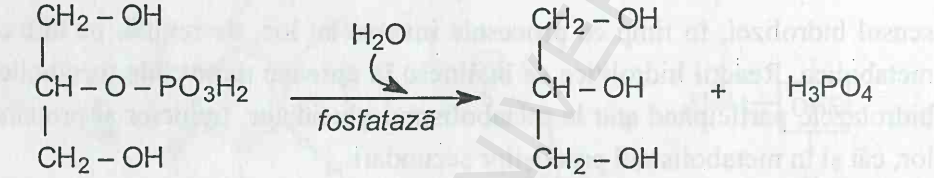
triacilglicerol glicerol acizi graşi

Spre deosebire de celelalte enzime, lipaza prezintă o particularitate legată de natura substratului asupra căruia acţionează, mai exact a lipidelor care sunt insolubile în apă. *In vivo* are loc mai întâi o emulsionare a grăsimilor (care în cazul animalelor se realizează cu ajutorul bilei secretată de ficat) şi în felul acesta creşte suprafaţa de contact dintre faza liposolubilă a substratului şi cea hidrosolubilă a enzimei. Din această cauză, viteza iniţială de reacţie este dependentă de numărul de molecule enzimatice adsorbite la interfază,

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

fiind, în general, mică. Ulterior, după formarea primelor molecule de acizi graşi, viteza de reacţie creşte datorită emulsionării mai rapide a substratului, moleculele de acizi graşi având zone cu proprietăţi hidrofobe şi hidrofile ($R-COO^-$).

Din aceeaşi clasă fac parte cele două ***fosfomonoesteraze*** (***fosfataze***), alcalină şi acidă cu denumirile sistemice ***ortofosfat-monoester-fosfohidrolaza (pH optim alcalin)*** (EC 3.1.3.1) şi respectiv ***ortofosfat-monoester-fosfohidrolaza (pH optim acid)*** (EC 3.1.3.2). Fosfataza alcalină catalizează scindarea hidrolitică a esterilor acidului ortofosforic ai alcoolilor primari, secundari şi ciclici, fenolilor etc., dar nu şi fosfodiesterii. Fosfataza acidă hidrolizează un mare număr de fosfomonoesteri, fosfoproteine şi altele:



β - Glicerofosfat Glicerol

Aceste două enzime prezintă o importanţă deosebită şi din punct de vedere medical, activitatea lor fiind determinată în sânge în scopul diagnosticării litiazelor biliare şi a diferitelor afecţiuni hepatice, respectiv a unor boli ale prostatei.

La catabolismul poliglucidelor participă o serie de hidrolaze specifice, numite ***amilaze***, atunci când substratul este amidonul sau glicogenul, ***celulaze*** ce acţionează asupra celulozei etc.

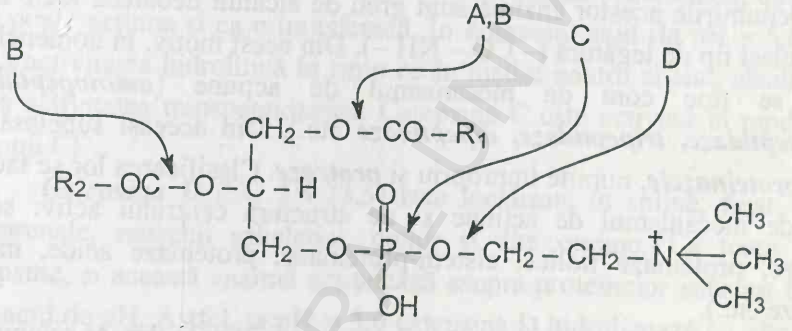
α-Amilaza (diastaza, glicogenaza etc.) a cărei denumire sistemică este ***α-1,4-D-glucan-glucanohidrolaza*** (EC 3.2.1.1) catalizează scindarea hidrolitică a legăturilor α-1,4-glicozidice din amidon şi glicogen cu formarea unor fragmente poliglucidice mai mici numite **dextrine**. Enzima este total inactivă faţă de legăturile α-1,6-glicozidice din punctele de ramificaţie ale moleculei substratului şi este o endoamilază.

β-Amilaza sau ***α-1,4-D-glucan-maltohidrolaza*** (EC 3.2.1.2) este tot o endoamilază şi catalizează hidroliza aceloraşi tipuri de legături glicozidice, dar nu haotic, ci prin clivarea resturilor de maltoză de la capetele

nereducătoare ale substratului polizaharidic. Nici această enzimă nu hidrolizează legăturile α-1,6-glicozidice. Acestea sunt scindate de ***izoamilază*** (sau enzima de deramificare) a cărei denumire sistemică este ***glicogen-6-glucanhidrolaza*** (EC 3.2.1.68).

γ-Amilaza numită şi ***glucoamilază*** sau ***amiloglucozidază (α-1,4-D-glucan-glucohidrolaza***, EC 3.2.1.3) este o exoamilază şi catalizează hidroliza legăturilor α-1,4-glicozidice din amidon şi glicogen cu formare de glucoză liberă.

Din clasa hidrolazelor mai face parte o grupă importantă de enzime cunoscute sub numele de ***fosfolipaze***, acestea fiind implicate în metabolismul glicerofosfolipidelor şi în special al lecitinelor. În prezent se cunosc patru fosfolipaze, notate A, B, C şi D, care scindează diferite legături esterice din fosfolipide:



Fosfolipaza A sau ***lecitinaza A*** (***fosfatidilcolină 1-acilhidrolaza***, EC 3.1.1.4) se întâlneşte în veninul de cobră, pancreas, timus, prostată, glandele salivare şi splină. Ea acţionează asupra fosfatidilcolinelor scindând restul de acid gras din poziţia α cu formare de lizolecitine şi acizi graşi liberi.

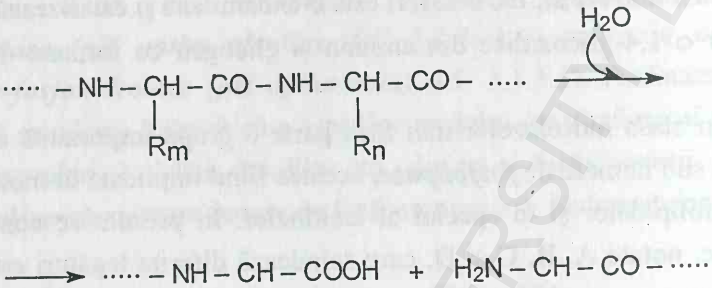
Fosfolipaza B, care se mai numeşte ***lecitinaza B***, sau ***lizolecitinaza*** (***2-lizofosfatidil-colină-acilhidrolaza***, EC 1.1.1.5) se găseşte în microorganisme, ficat şi pancreas şi scindează ambele resturi de acizi graşi din fosfatidilcoline cu formare de glicerol-fosfatidilcolină şi acizi graşi liberi.

Fosfolipaza C, denumită şi ***lecitinaza C***, sau ***lipofosfodiesteraza*** (***fosfatidil-colină colinfosfohidrolaza***, EC 3.1.4.3) se întâlneşte în creier şi rinichi şi scindează restul de fosfocolină cu formare de α,β-diacilglicerol.

BCU CLUJ-NAPOCA BABEŞ-BOLYAI UNIVERSITY LIBRARY

Fosfolipaza D, numită şi ***lecitinaza D*** sau ***lipofosfodiesteraza II*** (***fosfatidilcolină fosfatidohidrolaza***, EC 3.1.4.4) se găseşte numai în plante şi clivează restul colină din lecitine cu formare de acid L-α-fosfatidic.

O grupă importantă de hidrolaze o constituie enzimele din subclasa 3.4. ce acţionează asupra legăturilor peptidice, numite peptid-hidrolaze:



Denumirile acestor enzime sunt greu de alcătuit deoarece toate scindează acelaşi tip de legătură (– CO – NH –). Din acest motiv, în nomenclatura lor se ţine cont de mecanismul de acţiune (***aminopeptidaze, carboxipeptidaze, tripeptidaze, dipeptidaze*** etc.). Din aceeaşi subclasă fac parte şi ***proteinazele***, numite impropriu şi ***proteaze***. Clasificarea lor se face în funcţie de mecanismul de acţiune şi de structura centrului activ: serin-proteinaze, proteinaze tiolice, cistein-proteinaze, proteinaze acide, metal-proteinaze etc.).

Un rol extrem de important în procesul complex de reînnoire a proteinelor structurale îl joacă o serie de proteinaze tisulare reunite sub numele de *catepsine*. În prezent se cunosc mai multe catepsine notate cu majuscule ale alfabetului latin (A, B, C, D, E etc.) ce se deosebesc între ele după specificitatea de substrat, pH-ul optim de acţiune şi alte criterii. *Catepsina A*, sau *serin-carboxipeptidaza* (EC 3.4.16.1) se întâlneşte preponderent în muşchii scheletici şi splină şi mai puţin în alte ţesuturi. Studiul specificităţii de substrat a demonstrat faptul că această enzimă este asemănătoare din acest punct de vedere cu carboxipeptidaza A din sucul pancreatic. Studiile cinetice efectuate prin utilizarea substratului sintetic carbobenzoxi-glutaril-tirozina au arătat că această enzimă acţionează la un pH optim de 5,6. S-a mai demonstrat că cisteina şi glutationul redus manifestă un slab efect activator.

Catepsina B (EC 3.4.22.1) hidrolizează legăturile peptidice formate de aminoacizii aromatici, fiind activată de către cisteină. Această enzimă este

localizată preponderent în splină şi mai puţin în glanda tiroidă, ficat, plămâni, rinichi şi glandele suprarenale. Cele mai mici cantităţi se găsesc în sânge, inimă, creier şi muşchii scheletici. Într-o serie de experimente efectuate pe animale de laborator iradiate, s-a demonstrat că ponderea activităţii catepsinei B din splină revine fagocitelor. Acest lucru este extrem de important deoarece, în acest mod, catepsina B poate degrada proteinele prinse în fagocitoză. Ca şi celelalte catepsine, şi în cazul catepsinei B, activitatea maximă se înregistrează în domeniul acid, pH-ul optime de acţiune fiind de 3,0 – 6,0.

Catepsina C, numită şi ***dipeptidil-aminopeptidaza I***, sau ***dipeptidil-transferaza*** (EC 3.4.14.1) este o proteinază tiolică tipică, fiind răspândită în majoritatea ţesuturilor animale. Ea clivează hidrolitic resturile dipeptidice de la extremităţile N–terminale ale proteinelor substrat, putând fi considerată ca o aminopeptidază specială. În afară de capacitatea proteolitică, catepsina C mai poate acţiona şi ca o transferază. În domeniul acid (la pH = 5,0) predomină activitatea hidrolitică în timp ce în mediu neutru şi slab alcalin predomină activitatea transpeptidazică. Catepsina C este activată în mod specific de ionii Cl^-.

Catepsina D (EC 3.4.23.5) este localizată în splină, ficat, glandele suprarenale, muşchii scheletici, creier şi alte organe. Ca toate celelalte catepsine, şi această enzimă acţionează asupra proteinelor substrat în domeniul acid de pH. Astfel, la pH = 3,0 catepsina D hidrolizează cu viteză maximă hemoglobina denaturată, iar la pH = 4,2 albumina serică denaturată. Catepsina D nu acţionează însă asupra substratelor specifice celorlalte catepsine. Activitatea acestei enzime nu se modifică în prezenţa cisteinei, iodacetamidei, p-clormercuribenzoatului şi a EDTA (reactivi specifici pentru grupările tiolice) ceea ce demonstrează faptul că, spre deosebire de catepsinele B şi C, catepsina D nu este o proteinază tiolică. Ea joacă un rol important în catabolismul insulinei, scindând hidrolitic legătura peptidică $Gln_4 – His_5$ din molecula acesteia.

Catepsinele analizate mai sus sunt cunoscute de mai mult timp, atât din punctul de vedere al mecanismului de acţiune cât şi al rolului lor biologic. În ultimul timp însă au mai fost descoperite numeroase alte catepsine implicate în degradarea proteinelor din organismele animale.

Catepsina E, numită şi ***aspartat-proteinaza eritrocitară*** (EC 3.4.23.34) este asemănătoare catepsinei D din punct de vedere al specifi-

cității de acțiune. Se întâlnește preponderent în membrana eritrocitară, stomac și splină. Ea se sintetizează sub forma zimogenului său inactiv (*procatepsina E*) care este un dimer cu masa moleculară de 86 kDa în care cele două subunități sunt legate printr-o punte disulfidică. În procesul activării zimogenului are loc separarea celor doi protomeri. Același lucru se întâmplă și sub acțiunea diferiților agenți reducători.

Catepsina G (EC 3.4.21.20) are o specificitate de acțiune similară cu cea a chimotripsinei C. A fost identificată prima dată în leucocitele polimorfonucleare.

Catepsina H mai este cunoscută și sub numele de ***catepsina B_3*** (EC 3.4.22.16) și este prezentă în lisosomii celulelor din majoritatea țesuturilor la mamifere. Din punctul de vedere al mecanismului de acțiune, catepsina H este o aminopeptidază ce scindează preferențial legăturile peptidice formate de resturile de arginină la capetele N–terminale ale catenelor polipeptidice ale substratului. Poate însă acționa și ca o endopeptidază.

Catepsina L (EC 3.4.22.15) este o proteinază tisulară tiolică din organismul animal al cărei mecanism de acțiune este similar cu cel al papainei. Comparativ cu catepsina B, catepsina L prezintă o activitate mult mai mare față de proteinele native dar este lipsită de activitate dipeptidazică.

Catepsina S (EC 3.4.22.27) prezintă un mecanism de acțiune similar cu al catepsinei L dar viteza de scindare hidrolitică a legăturii peptidice ....–Phe–Arg–**X** este foarte scăzută. În schimb posedă o activitate hidrolitică foarte înaltă față de legătura peptidică ....–Val–Val–Arg–**X**. Catepsina S este o endopeptidază tiolică ce se deosebește net de celelalte catepsine prin stabilitatea foarte crescută la valori neutre de pH.

Catepsina T (EC 3.4.22.24) catalizează interconversia celor trei tipuri ale tirozin-aminotransferazei, jucând în felul acesta un rol deosebit în reglarea activității la nivel molecular a acestei enzime. Poate acționa, de asemenea, asupra azocazeinei și a hemoglobinei denaturate.

Catepsina X (EC 3.4.18.1) numită și ***catepsina B_2, catepsina IV, catepsina Z*** sau ***carboxipeptidaza lizozomală B*** este o cistein-carboxipeptidază acidă ce scindează resturile aminoacizilor C-terminali din proteinele substrat. Are o specificitate largă de acțiune putând cliva aproape toți aminoacizii C-terminali cu excepția prolinei. Este o cistein-proteinază din familia C_1 (familia papainei) relativ larg răspândită în țesuturile animale. Are

pH-ul optim de acțiune variabil, în funcție de substrat, pentru activitatea carboxipeptidazică acesta fiind de 5.0, în timp ce la valori de pH > 7,0 este instabilă.

În organismele mamiferelor există și alte proteinaze tisulare cu funcții biochimice și fiziologice bine determinate. Printre acestea se numără și proteinazele ***tisulare active în mediu neutru și alcalin***. Existența acestora a fost observată în multe organe și țesuturi și în primul rând în eritrocite, plămâni, mușchii striați, creier etc. Dintre acestea mai bine studiate sunt ***kininegeninele***, numite și ***kallicreine*** (EC 3.4.4.21.), enzime cu un pH optim de acțiune în domeniul slab alcalin. Cantitățile cele mai mari se întâlnesc în glandele salivare și în pancreas. Kallicreinele acționează asupra globulinei plasmatice din molecula căreia clivează o decapeptidă cu rol hormonal numită ***kallidină*** ce conține în moleculă trei resturi de prolină, câte două resturi de arginină și fenilalanină și câte un rest de lizină, glicocol și serină. Ca și în cazul celorlalte proteinaze pancreatice, kallicreina se sintetizează sub forma zimogenului său inactiv numit ***prokallicreină*** ce poate fi convertit în enzima activă atât autocatalitic cât și sub acțiunea hidrolitică a tripsinei.

Renina (EC 3.4.4.15) este o proteinază sintetizată în rinichi ce prezintă o înaltă specificitate de substrat. Această enzimă este total diferită de renina gastrică ce se întâlnește în stomacul rumegătoarelor în prima perioadă de viață.

Importanța fiziologică a reninei tisulare constă în participarea sa la sistemul hormonal de reglare a presiunii sanguine și a bilanțului hidromineral în organismul animal. Prin acțiunea sa asupra glicoproteinei plasmatice numită ***angiotensinogen*** sau ***hipertensinogen*** se formează ***angiotensina I*** care nu prezintă activitate fiziologică dar care reprezintă substratul așa-numitei ***enzime de convertire*** sub acțiunea căreia trece în ***angiotensina II*** cu un puternic efect vasoconstrictor. În felul acesta, renina reprezintă o peptid-hidrolază cu o înaltă specificitate de substrat care scindează hidrolitic legătura peptidică *Leu–Leu* din molecula angiotensinogenului.

Atât în sânge cât și în alte țesuturi se întâlnesc enzimele numite ***angiotensinaze*** care au rolul de a scinda în continuare angiotensina II ce își pierde în felul acesta activitatea fiziologică. Enzima din serul sanguin se numește ***angiotensinază A*** și este o aminopeptidază.

În diferite țesuturi animale au fost identificate unele ***aminopeptidaze*** care hidrolizează numai legăturile peptidice formate de aminoacizii bazici,

respectiv acizi. Astfel, hidroliza selectivă a resturilor N-terminale ale aminoacizilor monoamino-dicarboxilici este realizată de ***aminopeptidaza A*** care se găseşte în cantităţi mari în rinichi şi duoden şi care este activată de ionii de Ca^{2+}. Se mai cunoaşte o enzimă capabilă să cliveze resturile N-terminale de lizină şi arginină ale proteinelor substrat. Aceasta a primit numele de ***aminopeptidază B*** şi este activată de ionii de Cl^-. În afară de enzimele enumerate mai sus, în ţesuturile animale se mai întâlnesc şi alte enzime proteolitice: ***aminotripeptidaza***, unele ***dipeptidaze*** etc.

Rolul biochimic al enzimelor proteolitice tisulare nu este încă pe deplin elucidat. Se presupune că ele joacă un rol important în catabolismul proteinelor endogene pentru furnizarea aminoacizilor necesari proceselor biosintetice, contribuind în felul acesta la procesul de reînnoire continuă a proteinelor. Astfel, peste 50% din totalul aminoacizilor din ficat şi aproximativ 30% al celor din muşchi se formează în condiţii normale pe calea scindării proteinelor endogene, sub acţiunea proteinazelor tisulare. În primele etape ale foamei proteice însă, aceste cifre cresc considerabil (până la 90% şi respectiv 50%).

Proteoliza intracelulară mai poate juca un rol important într-o serie de alte procese fiziologice cu caracter mai aparte cum ar fi metamorfoza la insecte şi vertebrate, dezvoltarea imunităţii naturale şi altele. Proteinazele tisulare pot participa şi la biosinteza şi degradarea altor substanţe biologic active. Astfel, în afară de participarea reninei la formarea angiotensinei I şi cea a kallicreinelor la biosinteza kallidinei, se mai cunoaşte participarea catepsinelor lisosomale din glanda tiroidă la formarea triiodtironinei şi tiroxinei. Este, de asemenea, posibil ca proteinazele intracelulare din pancreas să joace un rol important în biosinteza insulinei din precursorul acesteia – proinsulina. Acest proces infirmă teoria conform căreia proteoliza tisulară ar fi numai o cale de degradare a proteinelor, proteinazele putând juca un rol activ în formarea unor molecule proteice specifice.

Atât plasma cât şi elementele figurate ale sângelui conţin un evantai complex de enzime proteolitice a căror acţiune coordonată stă la baza unor importante procese biochimice şi fiziologice cum ar fi coagularea sângelui, prevenirea formării trombelor în vasele sanguine şi liza trombelor deja formate, biosinteza şi degradarea peptidelor biologic active etc. ***Trombina*** (EC 3.4.4.13) îndeplineşte în organismul animal cel puţin două funcţii importante. Pe de o parte, trombina realizează conversia fibrinogenului în fibrină care

apoi se polimerizează spontan. Pe de altă parte, trombina catalizează reacția de activare a factorului XIII (așa-numitul factor fibrino-stabilizator) implicat în procesul coagulării sanguine. Factorul activ XIII astfel format, sau ***fibrinaza***, reprezintă de fapt enzima numită ***transglutaminază*** ce convertește fibrina solubilă în fibrină insolubilă prin formarea de legături transversale între resturile de lizină ale unui monomer de fibrină și respectiv resturile de acid glutamic aparținând altui monomer.

Trombina se găsește în plasma sanguină preponderent sub forma zimogenului său inactiv numit ***protrombină***. Alături de protrombină, în plasma normală sunt prezente și cantități mici de enzimă activă. Protrombina se sintetizează în ficat, acest proces fiind reprimat în avitaminoza K sau în prezența dicumarolului (care este cea mai importantă antivitamină K). Protrombina aparține clasei glicoproteinelor, are o structură asemănătoare cu cea a globulinelor și prezintă un conținut ridicat de glucide. Cu toate acestea, structura moleculei de protrombină și mecanismul prin care aceasta este convertită în trombină activă nu sunt pe deplin elucidate.

Reacția de activare a protrombinei este puternic activată în prezența trombinei și mai ales a ***autoprotrombinei C*** (numită ***trombokinaza*** sau factorul activ X).

Plasmina (sau ***fibrinolizina***, EC 3.4.4.14) este o altă proteinază importantă din plasma sanguină. Ea este activă în mediu neutru și are o specificitate foarte largă de substrat, fapt ce o diferențiază net de trombină și alte enzime proteolitice din sânge. Plasmina se întâlnește la mamifere, pești, amfibieni și păsări. Datorită capacității sale hidrolitice foarte înalte în raport cu fibrina și fibrinogenul, plasmina este unul din componenții principali ai sistemului de anticoagulare sanguină. Din această cauză ea este utilizată în practica medicală pentru tratamentul maladiilor trombo-embolice.

Plasmina se găsește în sânge preponderent sub forma precursorului său inactiv numit ***plasminogen*** sau ***profibrinolizină***. Acest precursor se sintetizează în celulele măduvei osoase de unde pătrunde în sânge și alte țesuturi. Conversia plasminogenului în plasmina activă se realizează atât autocatalitic cât și sub acțiunea tripsinei și a unor activatori specifici (fig. 8). Toți activatorii cunoscuți ai plasminogenului sunt enzime proteolitice. În procesul de activare are lor scindarea hidrolitică a legăturilor peptidice realizate de grupele carboxilice ale resturilor de lizină și arginină. În timpul conversiei plasminogenului uman sub acțiunea diferiților activatori (ca de exemplu

urokinaza, streptokinaza, tripsina etc.), are loc ruperea unei legături peptidice de tipul *Arg–Val*.

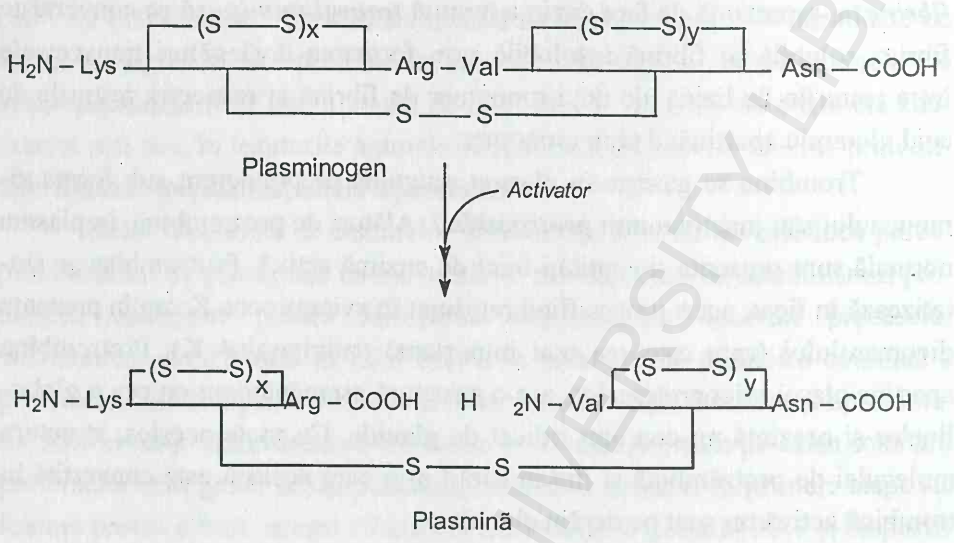


Fig.8. Reprezentarea schematică a mecanismului conversiei plasminogenului în plasmină (Vl. Artenie – 1991)

Numărul punților disulfidice este x + y = 21. În urma scindării legăturii peptidice *Arg–Val* se formează molecula plasminei care conține două catene polipeptidice, spre deosebire de zimogenul său care este format dintr-un singur lanț polipeptidic. Cele două catene polipeptidice se unesc printr-o punte disulfidică a cărei degradare conduce la pierderea capacității catalitice.

În afară de trombină și plasmină, sângele mai conține și alte proteinaze. Un grup important din punct de vedere fiziologic și biochimic de proteinaze sanguine include ***kallicreinele*** a căror funcție constă în eliberarea peptidelor hipotensive numite ***kinine*** prin degradarea parțială a proteinelor plasmatice, precum și enzimele implicate în degradarea ulterioară a kininelor.

Kallicreina din plasma sanguină se deosebește de kallicreinele pancreasului și glandei salivare atât din punctul de vedere al proprietăților fizico-chimice, și al sensibilitatății lor față de inhibitori, cât și după specificitatea de substrat.

Prin acțiunea kallicreinei asupra ***kininogenului*** (care este o α-glicoproteină) se eliberează nonapeptida numită ***bradikinină*** care posedă capacitatea de a diminua presiunea sanguină, de a determina contracția mus-

ECU "ASTRA" UNIVERSITY LIBRARY

culaturii netede etc. Eliberarea bradikiniei poate avea loc şi în urma acţiunii tripsinei şi a enzimelor din veninul şerpilor asupra proteinelor plasmatice.

Kallicreina plasmatică, ca şi în cazul kallicreinelor tisulare, se sintetizează sub forma zimogenului său inactiv numit ***prekallicreină*** sau ***kallicreinogen***. Acesta este convertit în kallicreină activă sub acţiunea tripsinei sau a factorului XII.

În plasma sanguină umană şi cea a unor animale se găseşte ***carboxipeptidaza N***, o enzimă ce determină inactivarea bradikininei şi kallidinei prin clivarea restului C-terminal de arginină. O activitate proteolitică însemnată o posedă şi elemente figurate ale sângelui. În eritrocite de exemplu apar diferite peptidaze, iar leucocitele sunt bogate în diferite proteinaze.

O altă grupă de proteinaze de origine animală, cu rol important în digestia proteinelor o reprezintă enzimele proteolitice ale tractului digestiv. Aceste enzime sunt secretate de pancreas şi glandele din mucoasa tubului digestiv alături de enzimele ce participă la digestia celorlalte componente ale bolului alimentar. La nivelul stomacului sunt secretate ***pepsina, gastricsina*** şi ***renina***, pancreasul sintetizează şi secretă ***tripsina***, ***chimotripsina*** şi ***carboxipeptidazele***, iar sucul intestinal conţine ***enteropeptidaza, aminopeptidaze, tripeptidaze, dipeptidaze*** şi ***carboxipeptidaze***. Unele enzime sunt secretate sub forma zimogenilor lor inactivi. Aceştia sunt convertiţi în enzime active prin scindarea hidrolitică a anumitor legături peptidice cu îndepărtarea unor fragmente oligopeptidice.

Pepsina (EC 3.4.4.1) este răspândită în sucul gastric al tuturor vertebratelor. Pepsinele izolate din diferite surse se deosebesc între ele prin unele proprietăţi cum ar fi stabilitatea, structura primară, specificitatea de substrat etc. Dat fiind faptul că în condiţii fiziologic normale pH-ul sucului gastric se situează în zona puternic acidă (1,0 – 2,0), pepsina posedă o stabilitatea foarte mare în mediu puternic acid. Ea este activă în intervalul de pH 1,0 – 4,0 cu un pH optim de acţiune de 1,8, iar la pH = 5,0 pepsina se denaturează.

Pepsina este sintetizată sub forma zimogenului său inactiv numit ***pepsinogen***. Conversia acestuia în pepsină activă are loc la pH acid, sub influenţa protonilor după care continuă autocatalitic în sensul că pepsina formată catalizează conversia în continuare a pepsinogenului în enzimă activă. Activarea pepsinogenului constă în clivarea hidrolitică a unor fragmente oligopeptidice de la capătul N-terminal ceea ce face să existe o diferenţă rela-

tiv mare între masa moleculară a zimogenului (42.000 Da) şi cea a enzimei active (34.500 Da). Procesul de activare a pepsinogenului constă într-o reacţie de proteoliză limitată. În acest proces de activare, din molecula pepsinogenului este îndepărtată o peptidă cu masa moleculară de 3.100 Da care reprezintă inhibitorul pepsinei şi alte 5 oligopeptide diferite cu masele moleculare de aproximativ 1.000 Da. Cu toate acestea, mecanismul complet al activării pepsinogenului nu este încă pe deplin elucidat.

Atât molecula pepsinei cât şi cea a pepsinogenului conţin câte un singur capăt N-terminal şi respectiv C-terminal ceea ce demonstrează faptul că acestea sunt formate din câte un singur lanţ polipeptidic. La capătul N-terminal al moleculei pepsinogenului se află un rest de lizină, iar în molecula pepsinei un rest de izoleucină în timp ce la capătul C-terminal al ambelor forme se găseşte câte un rest de alanină. Atât pepsina cât şi pepsinogenul conţin în moleculă câte 3 punţi disulfidice intracatenare.

Pepsina prezintă o mare afinitate pentru aminoacizii aromatici. De aceea ea hidrolizează în proteine acele legături peptidice la formarea cărora participă grupările aminice ale fenilalaninei şi tirozinei cu formarea unor peptide ale căror mase moleculare oscilează între 600 şi 3.000 Da. Pepsina nu hidrolizează însă keratinele, fibroina, ovomucoidul şi are o acţiune limitată asupra protaminelor şi a proteinelor din oase şi cartilaje.

Gastricsina (EC 3.4.4.22) este o enzimă proteolitică ce a fost evidenţiată în sucul gastric la om, porc şi câine. Spre deosebire de pepsină, gastricsina are un pH optim de acţiune ceva mai crescut (3,2 faţă de 1,8). Ea se mai deosebeşte de pepsină prin mobilitatea sa electroforetică, termostabilitate şi specificitate de substrat.

Renina (EC 3.4.4.3) se întâlneşte în stomacul rumegătoarelor şi, probabil, al copiilor sugari. Cea mai bine studiată este renina din stomacul viţeilor cunoscută sub numele uzual de ***cheag***. Această enzimă a fost folosită din cele mai vechi timpuri la fabricarea brânzeturilor, sub formă de extract de cheag. Renina mai este cunoscută şi sub alte denumiri: ***ferment de cheag, labferment, chimază, chimozină*** etc. pH-ul optim de acţiune al reninei se situează în jurul valorii de 3,5, iar din punctul de vedere al specificităţii de substrat renina se asemănă cu pepsina. Această enzimă se sintetizează în mucoasa gastrică sub forma zimogenului său numit ***prorenină***, iar mecanismul conversiei în renină activă este asemănător cu cel al activării pepsinogenului.

Enzimele proteolitice sintetizate în pancreas se formează tot sub forma precursorilor lor inactivi, locul biosintezei reprezentându-l reticulul endoplasmatic al celulelor acinare ale acestei glande cu funcțiune mixtă.

Tripsina (EC 3.4.4.4) este sintetizată și secretată de către pancreasul exocrin sub forma zimogenului său – ***tripsinogen***.

Conversia acestuia în enzimă activă este inițiată de ***enterokinază (enteropeptidază)***, enzimă secretată în sucul intestinal după care procesul continuă autocatalitic în sensul că primele molecule de tripsină formate catalizează transformarea a noi molecule de tripsinogen. Procesul de conversie a tripsinogenului în tripsină activă constă în scindarea hidrolitică a legăturii peptidice $Lys_6 - Ile_7$ din molecula zimogenului cu eliberarea hexapeptidei *Val – (Asp)$_4$ – Lys* situată la extremitatea N-terminală a catenei polipeptidice. Această reacție este activată de ionii de calcium (fig. 9.).

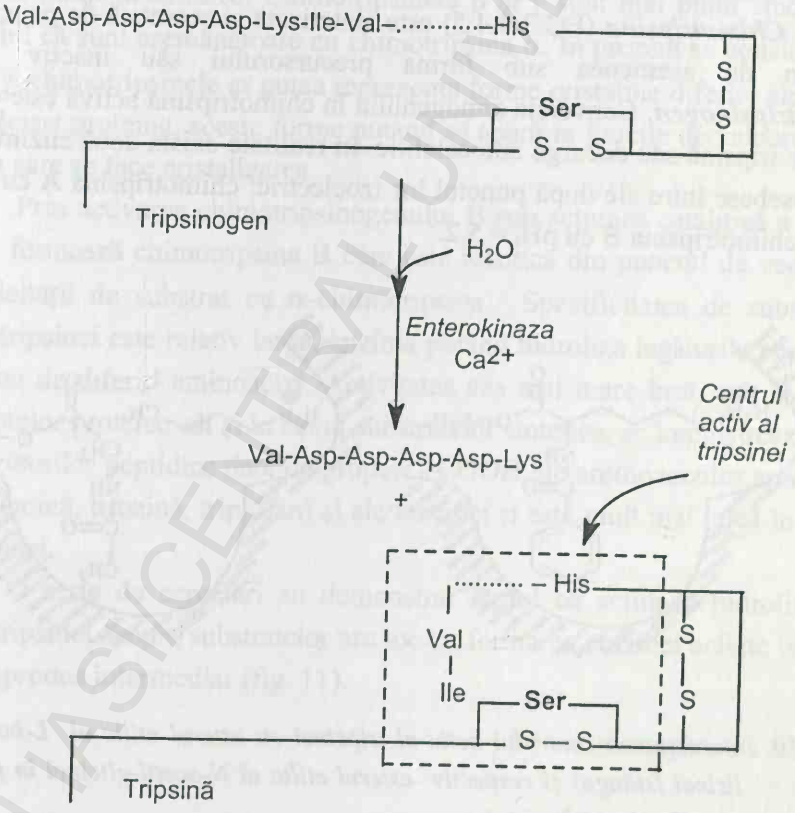


Fig. 9. Reprezentarea schematică a mecanismului activării tripsinogenului (Vl. Artenie – 1991)

BCU IAȘI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Tripsinele izolate din surse diferite au o structură primară asemănătoare dar nu identică. Astfel, tripsinele de om şi curcan, conţin câte patru punţi disulfidice, iar cele izolate din intestinul de bou, porc şi oaie conţin şase asemenea legături. Spre deosebire de tripsinele de la mamifere, tripsina de curcan are un conţinut foarte scăzut în lizină.

Activitatea maximă a tripsinei se manifestă la pH cuprins între 7,0 şi 9,0 enzima hidrolizând preponderent legăturile peptidice la formarea cărora participă grupele –COOH ale lizinei şi argininei. La nivelul intestinului subţire unde se varsă sucul pancreatic, tripsina hidrolizează aceste legături în polipeptidele rezultate în urma acţiunii pepsinei la nivel gastric.

Mecanismul de acţiune al tripsinei a fost descifrat în urma unor experimente în care s-au utilizat o serie de substrate sintetice cum ar fi etil-benzoil-lizina şi etil-N-acetilglicocolul (fig. 10).

Chimotripsina (EC 3.4.4.5) este sintetizată şi secretată de pancreasul exocrin de asemenea sub forma precursorului său inactiv numit ***chimotripsinogen***. Conversia zimogenului în chimotripsină activă este catalizată de tripsină sau decurge autocatalitic. În realitate există două enzime care se deosebesc între ele după punctul lor izoelectric: chimotripsina A cu pH_i = 9,1 şi chimotripsina B cu pH_i = 5,2.

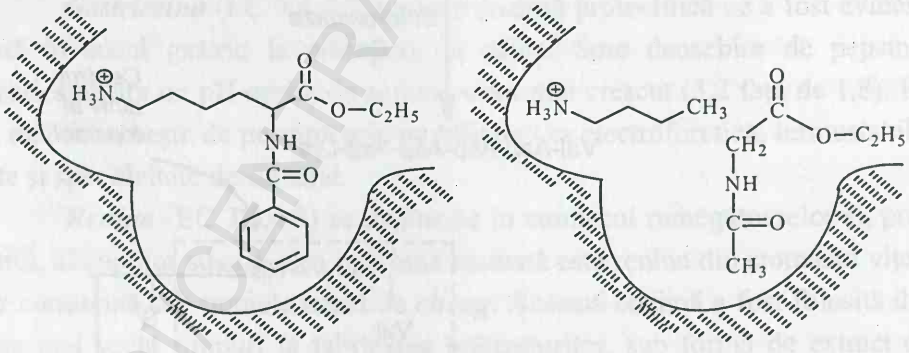


Fig. 10. Interacţiunea centrului activ al tripsinei cu esterul etilic al L-benzoil-L-lizinei (stânga) şi respectiv esterul etilic al N-acetil-glicinei în prezenţa propilaminei (dreapta)

Conversia chimotripsinogenului A în enzimă activă este un proces complex ce determină apariţia a cinci chimotripsine notate cu α, β, γ, δ, şi π.

La bovine, în procesul de activare a chimotripsinogenului A se scindează hidrolitic legătura peptidică $Arg_{15} - Ile_{16}$ din molecula zimogenului cu formarea chimotripsinei π, aceasta reprezentând primul produs al acțiunii tripsinei. În continuare, în molecula chimotripsinei π se scindează autocatalitic legătura peptidică $Leu_{13} - Ser_{14}$ când se formează chimotripsina δ și se eliberează dipeptida seril-arginină ce corespunde resturilor de aminoacizi din pozițiile 14 și 15 ale moleculei zimogenului.

Din chimotripsina δ se eliberează dipeptida treonil-asparagina și se formează chimotripsina α în urma hidrolizei autocatalitice a legăturilor peptidice din pozițiile 146 – 147 și respectiv 148 – 149. Chimotripsinele π și δ conțin în moleculele lor câte două catene polipeptidice, în timp ce molecula chimotripsinei α conține trei asemenea catene notate cu A, B și C, unite între ele prin punți disulfidice. Chimotripsinele β și γ sunt mai puțin studiate și probabil că sunt asemănătoare cu chimotripsina α. În prezent se consideră că α– și γ–chimotripsinele ar putea reprezenta forme cristaline diferite ale uneia și aceleiași proteine, aceste forme putând să apară în funcție de valoarea pH-ului la care se face cristalizarea.

Prin activarea chimotripsinogenului B sub acțiunea catalitică a tripsinei se formează chimotripsina B care este identică din punctul de vedere al specificității de substrat cu α-chimotripsina. Specificitatea de substrat a chimotripsinei este relativ largă, enzima putând hidroliza legăturile peptidice realizate de diferiți aminoacizi. Activitatea cea mai mare însă, atât în cazul substratelor proteice cât și în cel al substratelor sintetice, se înregistrează asupra legăturilor peptidice date de grupele –COOH ale aminoacizilor aromatici (fenilalanină, tirozină, triptofan) și ale leucinei și este mult mai mică în cazul metioninei.

O serie de cercetări au demonstrat faptul că acțiunea hidrolitică a chimotripsinei asupra substratelor are loc cu formarea enzimei acilate în calitate de produs intermediar (fig. 11).

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

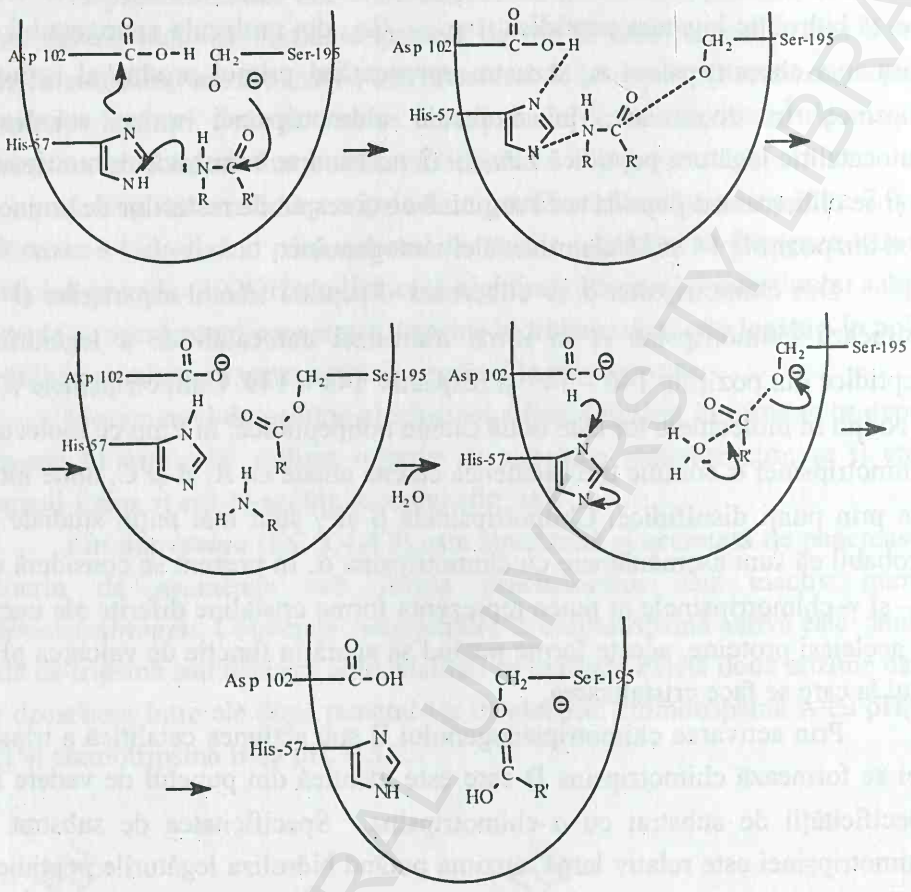


Fig. 11. Reprezentarea schematică a mecanismului de acțiune al chimotripsinei (I.F.Dumitru, 1981)

Centrul activ al chimotripsinei, ca de altfel şi cel al tripsinei, conține resturile *His*$_{57}$ şi *Ser*$_{195}$ care sunt dispuse în aşa fel încât nucleul imidazolic este localizat la o distanță mai mică de 4 Å de atomul de oxigen al serinei. Atomul N_2 al histidinei formează o legătură de hidrogen cu hidroxilul serinei, iar a doua legătură de hidrogen ia naştere între N_4 al restului de histidină şi grupa carboxilică a restului *Asp*$_{102}$, rest situat în interiorul moleculei enzimatice. Chiar dacă aranjamentul spațial şi structura centrului activ sunt aproape identice la cele două enzime proteolitice, specificitatea de substrat este diferită, tripsina având afinitate pentru legăturile peptidice formate de gruparea carboxilică a argininei sau lizinei cu alți aminoacizi, în timp ce chimotripsina

BCU "MIHAIL KOGĂLNICEANU" CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

manifestă specificitate față de legăturile peptidice formate de tirozină, triptofan, fenilalanină sau leucină (fig. 12).

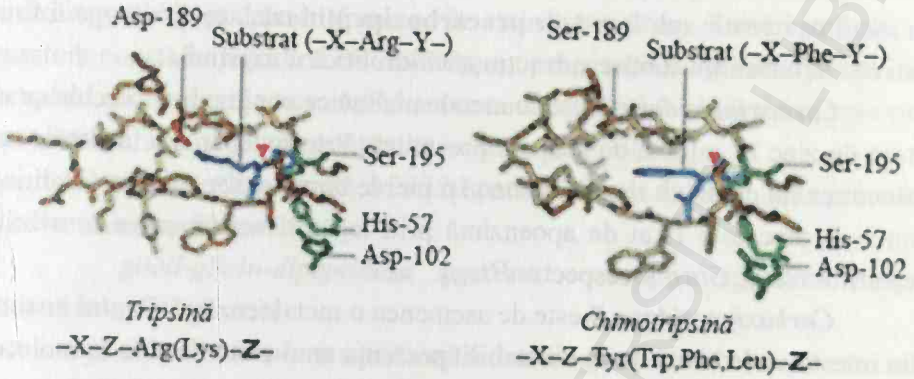


Fig 12. Reprezentarea schematică a structurii centrului activ și a specificității de substrat ale tripsinei și chimotripsinei (Koolman, J. et al. – 2005)

Se formează un sistem de punți de hidrogen ce determină o creștere a sarcinii negative la hidroxilul serinei din care cauză oxigenul acesteia poate ataca cu ușurință carbonul carbonilic al legăturii ce urmează a se hidroliza.

Deoarece pepsina, tripsina și chimotripsina scindează hidrolitic legăturile peptidice din interiorul catenelor polipeptidice ale proteinelor substrat, ele aparțin grupului de enzime numite ***endopeptidaze***, spre deosebire de carboxipeptidaze, aminopeptidaze și dipeptidaze care sunt ***exopeptidaze*** deoarece catalizează hidroliza resturilor de aminoacizi terminali.

Carboxipeptidazele (cu denumirea științifică **α-carboxipeptid-aminoacid-hidrolaze**, EC 3.4.2) alcătuiesc un grup de enzime proteolitice care catalizează hidroliza resturilor de aminoacizi de la extremitățile C–terminale ale catenelor polipeptidice. În sucul pancreatic se întâlnesc zimogenii a două carboxipeptidaze notate cu A și B. Aceste două enzime se deosebesc între ele în funcție de viteza cu care hidrolizează resturile C-terminale ale diferiților aminoacizi. Astfel, **carboxipeptidaza A** (EC 3.4.2.1) are o mare afinitate față de aminoacizii aromatici și cei alifatici cu catenă scurtă aflați în pozițiile C-terminale, în timp ce **carboxipeptidaza B** (EC 3.4.2.2) catalizează cu viteză mare hidroliza resturilor C-terminale ale aminoacizilor bazici (lizină și arginină). Datorită înaltei lor specificități, ambele enzime se utilizează cu succes în biochimia proteinelor la determinarea

structurii primare a acestora, mai exact la determinarea secvențelor C-terminale ale proteinelor și peptidelor. Ca și în cazul celorlalte enzime proteolitice ale tractului digestiv, carboxipeptidazele sunt sintetizate și deversate în sucul pancreatic sub formă de **procarboxipeptidaze**, aceşti zimogeni fiind activați în intestinul subțire sub acțiunea hidrolitică a tripsinei.

Carboxipeptidaza A este o metaloenzimă ce conține în molecula sa un atom de zinc în calitate de grupare prostetică. Prin îndepărtarea acestuia sau înlocuirea lui cu un alt metal, enzima își pierde complet capacitatea catalitică. Ionul de zinc este fixat de apoenzimă prin legături coordinative la nivelul resturilor His_{69}, Glu_{72} și respectiv His_{196}.

Carboxipeptidaza B este de asemenea o metaloenzimă. Pentru enzima din intestinul de bou și porc s-a stabilit prezența unui atom de zinc în moleculă, atom care se leagă de apoenzimă la nivelul unei grupe sulfhidril a unui rest de cisteină .

În sucul intestinal se găsesc, de asemenea, o serie de enzime proteolitice care îndeplinesc un rol bine determinat atât în digestia propriu-zisă a proteinelor cât și în activarea zimogenilor celorlalte proteinaze.

Enteropeptidaza sau ***enterokinaza*** (EC 3.4.4.8) este o enzimă proteolitică a cărei funcție biochimică principală constă în declanşarea procesului de conversie a tripsinogenului în tripsină activă.

Aminopeptidazele (***α-aminopeptid-aminoacid-hidrolaze***, EC 3.4.1) sunt peptid-hidrolaze care scindează resturile aminoacizilor localizați la extremitățile N-terminale ale peptidelor și proteinelor substrat. Există mai multe aminopeptidaze ce se deosebesc între ele în primul rând în funcție de specificitatea de substrat dar și în funcție de alte proprietăți.

Dintre acestea, mai bine studiată este ***leucil-aminopeptidaza*** (EC 3.4.1.1) care hidrolizează aminoacidul N-terminal atunci când acesta este leucina. De foarte mult timp s-a considerat că aceasta este o metalo-enzimă dar, abia în 1969 s-a demonstrat că molecula leucil-aminopeptidazei conține un atom de zinc și că îndepărtarea acestuia sau înlocuirea lui cu un atom de cadmiu conduce la pierderea completă a capacității catalitice. Această enzimă este activă în mediu slab alcalin, pH-ul său optim de acțiune situându-se între 8,0 și 9,0.

Aminotripeptidaza (***aminoacil-dipeptid-hidrolaza***, EC 3.4.1.3) este răspândită nu numai în intestin ci și în piele, sânge, plămâni, mușchi și alte organe și țesuturi. Această enzimă acționează asupra tripeptidelor ce conțin în

moleculă resturi de aminoacizi neutri, hidrolizând aminoacidul ce ocupă poziția N-terminală.

Dipeptidazele (***dipeptid-hidrolazele***, EC 3.4.3) sunt enzime ce hidrolizează dipeptidele cu formare de aminoacizi liberi. Rolul biochimic al acestora constă în faptul că ele desăvârşesc procesul de digestie a proteinelor ocupând deci o poziție terminală în succesiunea reacțiilor hidrolitice prin care proteinele alimentare sunt convertite în aminoacizi liberi.

Dipeptidazele prezintă o înaltă specificitate de substrat, cele mai bine studiate fiind următoarele:

– ***glicil-glicin-dipeptidaza*** prezintă o acțiune specifică asupra dipeptidei glicil-glicină;

– ***L-leucin-hidrolaza*** scindează hidrolitic glicil-leucina;

– ***imino-dipeptidaza***, cunoscută şi sub denumirea de ***prolinază***, acționează asupra diferitelor dipeptide în care poziția N-terminală este ocupată de prolină sau hidroxiprolină;

– ***imido-dipeptidaza*** sau ***prolidaza*** este singura enzimă proteolitică ce poate hidroliza legăturile peptidice al căror atom de azot nu este legat de hidrogen.

O grupă de enzime proteolitice extrem de intens studiată în ultima vreme o reprezintă ***caspazele*** (***c****ysteinil* – ***asp****artate* – *cleaving prote****ases***), cistein-proteinase responsabile de distrugerea progresivă a celulei prin apoptoză.

Moartea celulară programată este parte integrată a fiziologiei normale a unui organism. Astfel, în cursul numeroaselor mitoze şi diferențieri celulare care permit crearea unui organism pornind de la stadiul de ou, este necesară eliminarea celulelor inutile sau potențial periculoase. Acest fenomen de eliminare selectivă a celulelor este mediat printr-un proces denumit **apoptoză** (termenul provine de la grecescul *αποπτοσισ*, ce înseamnă „*căderea frunzelor*").

Noțiunea de apoptoză a fost introdusă în 1972 de către *Kerr şi et al.*. pentru a indica o formă de moarte celulară total diferită de necroză atât din punct de vedere morfologic cât şi biochimic. Apoptoza se întâlneşte la toate tipurile de celule vegetale sau animale, uni- sau pluricelulare, până la nivelul mamiferelor superioare (*Hockenbery, D.* – 1994 ; *Maarouf, A. et al.* – 1997).

O dereglare de la moartea celulară programată poate sta la originea numeroaselor stări patologice; unele sunt legate de o inhibiție a apoptozei

(cancer, sindrom limfoproliferativ etc), în timp ce altele sunt asociate cu o stimulare a acestui fenomen (SIDA, maladiile neurodegenerative, maladiile auto-imune etc.) (*Toompson, C. B.* - 1995).

În cursul apoptozei, celulele pun în evidență un "***mecanism de sinucidere***" care se traduce prin numeroase schimbări morfologice: membranele plasmatice se dezorganizează şi exprimă semnale pro-fagocitare alcătuind corpii apoptotici, cromatina se condensează înainte de a fi degradată într-un profil caracteristic numit "*treptele scării*". Corpii apoptotici formați sunt apoi rapid eliminați de către celulele adiacente. Această eliminare este primordială deoarece ea nu permite lăsarea nici unei urme în țesutul unde survine apoptoza, în particular, previnenind toate necrozele secundare care vor avea drept consecință eliberarea aleatorie a conținutului celular şi va permite astfel limitarea stabilirii unei reacții inflamatorii.

Necroza şi apoptoza. Necroza este considerată ca o moarte celulară dezordonată. În fapt în cursul necrozei celulele acumulează apă astfel încât antrenează liza membranei plasmatice. Această veritabilă explozie celulară conduce la redetaşarea în mediul înconjurător a conținutului citoplasmatic. Organitele vor avea, de asemenea, tendința de a se gonfla, iar ADN-ul nuclear va fi degradat în manieră „aleatorie" de endoglucanaze activate (mai ales serin-proteinaze) (*Dong, Z. et al.* – 1997). În opoziție cu necroza, apoptoza este considerată ca o moarte celulară „ordonată", acționând în diferite faze (*Duvale E., Wyllie A.H.* – 1985). Mai întâi celulele în apoptoză vor fi izolate de alte celule (dispare contactul între celule).

Unul din punctele morfologice caracteristice al apoptozei este importanța condensării simultane a nucleului şi a citoplasmei ce induce o diminuare semnificativă a volumului celular. Mitocondriile celulelor apoptotice vor suferi mai multe modificări majore, dintre ace amintim detaşarea citocromului c în citoplasmă (*Kluck, R. M. et al.* - 1997), diminuarea potențialului membranar şi modificarea permeabilității mitocondriale care permite deschiderea porilor specializați (*Marchetti, P. et al.* - 1996).

Nucleul se condensează, apoi cromatina este clivată în fragmente regulate de aproximativ 180 pdb (*Wyllie, A. H. et al.* – 1984). Membrana plasmatică va înmuguri şi va conduce la formarea corpilor apoptotici reînchizând o parte din citoplasmă în celulă. În scopul de a facilita recunoaşterea corpilor apoptotici prin fagocitoză, celulele vor semnala starea lor apoptotică grație schimbărilor de localizare a moleculelor de fosfatidilserină care trec de la o

orientare citoplasmatică la una extracelulară. Moartea celulară programată este un proces rapid – câteva ore. Unul din punctele majore ale apoptozei este integritatea membranei plasmatice care nu este niciodată alterată în cursul procesului, ceea ce permite evitarea deversării conținutului celular și astfel, prevenirea tuturor deteriorărilor țesuturilor din jur. Totuși, inflamarea nu este total absentă în timpul apoptozei (având în vedere externalizarea IL-1 și IL - 18 în mediul înconjurător) însă este vorba de o inflamare regulată.

Mecanismul molecular al apoptozei. Marea majoritate a datelor actuale privind mecanismele moleculare ale reglării apoptozei provin de la experiențele efectuate asupra nematodului *Caenorhabditis elegans* (*Hengartner, M. O. et al.* - 1994). Astfel, selecția prin mutageneză chimică a larvelor ce prezintă defectul de a nu elimina celulele în cursul dezvoltării, a permis identificarea a 11 gene implicate în reglarea morții celulare programate la *Caenorhabditis elegans*. Dintre acestea, trei fuseseră identificate ca reglatori cheie ai apoptozei în toate celulele somatice, fiind vorba de *ced-3, ced-4* și *ced-9* (*ced* pentru „*Caenorhabditis elegans* death"). Primele două gene, *ced-3* și *ced-4,* sunt obligatorii pentru moartea celulară, în timp ce *ced-9* este capabilă de a promova supraviețuirea prin acțiunea antagonistă genelor *ced-3* și *ced-4*. Astfel, o pierdere parțială a funcției *ced-9* este letală, ca urmare a unei morți celulare accentuată.

Clonarea acestor gene dovedește că:

- *ced-3* este codul unei cistein-proteaze omoloagă enzimei de conversie a IL-1b (ICE, acum denumită caspaza 1) (*Yuan, J.* - 1993);
- *ced-4* este codul pentru o proteină omoloagă proteinei umane Apaf-1
- *ced-9* este codul pentru o proteină omoloagă proteinei antiapoptotice Bcl-2, în prealabil identificată la om (White, E. – 1996);

A fost demonstrat că CED-4 este capabilă de a interacționa simultan cu CED-3 și CED-9 (*Chinnaiyan, A. M. et al.* – 1997). Acest rezultat ține cont de diferitele niveluri de reglare între aceste proteine și omologii lor la mamifere.

Modificările morfologice și biochimice observate în celulele decedate prin procesul de apoptoză sunt mediate de către familia cistein-aspartazelor sau caspazelor (*cysteine protease cleaving an aspartic acid residue*). Aceste enzime apoptogene sunt proteaze ale cisteinei care posedă o specificitate strictă a clivajului substratului lor asupra unui rest de acid aspartic. Această specificitate de acțiune n-a fost întâlnită decât la o singură protează, ***grazima***

B, o serin-protează prezentă în limfocitele T citotoxice. Nomenclatura propusă de *Alnemri et al.* regrupează proteazele apoptozei sub numele de ***caspaze*** (tabelul III). Această familie de 14 caspaze este constituită din proenzime care, prin proces proteolitic, generează forme active. Prima caspază cronologic caracterizată a fost ICE (*Interleukine Converting Enzyme*) care a fost redenumită caspaza 1.

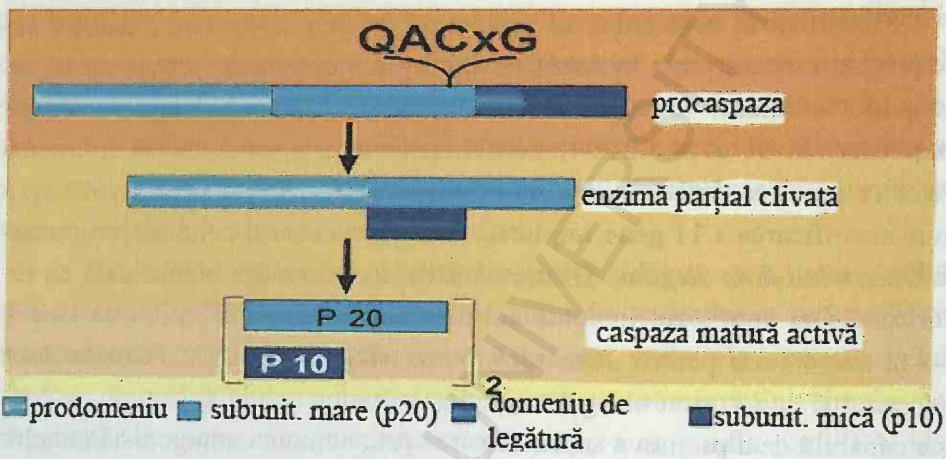


Fig. 13. Structura şi activarea procaspazelor (Rathmell et al. 1999)

Structura caspazelor. Toate caspazele au o structură ce cuprinde: un prodomeniu N-terminal de talie variabilă, un domeniu care va deveni după clivaj o subunitate mare (17-21 kDa, care are centrul activ) şi un domeniu care va deveni după clivaj o subunitate mică de (10-14 kDa) (fig. 13).

Anumiți membri ai familiei de caspaze prezintă şi o regiune scurtă de legătură între subunitatea mare şi cea mică (*Earnshaw, W. C. et al.* - 1999). Prodomeniile sunt variabile atât în ceea ce priveşte talia cât şi secvențele acestora. Astfel, caspazele 3, 6 şi 7 au un mic prodomeniu, în timp ce, caspazele 1, 2, 4, 5, 8, 9, 10, 11, 12 şi 13 prezintă un domeniu mare. Caspazele cu un mic prodomeniu sunt adesea regrupate sub numele de ***caspaze efectoare***. Acestea sunt activate de către caspaze denumite ***caspaze inițiatoare***.

Tabelul III

Clasificarea caspazelor (Alnemri, F. et al. – 1996)

Noua şi vechea denumire	Situsul de clivaj în zimogene	Substrate preferenţiale	Posibilitate de autoactivare	Localizarea cromozomială
Caspaza 1 ICE	TPLD/S FEDD/A AVQD/N	YEVD-X WEHD-X	+	11q22
Caspaza 2 Ich-I_L NEDD2	DQQD/G EESD/A DNKD/G	VDVAD-X DEHD-X	+	
Caspaza 3 CPP32 Apopaina	IETD/S - ESMD/S	DMQD-X DEVD-X	+	4q34
Caspaza 4 $ICE_{rel}II$ Tx, Ich-2	WVRD/S LEED/A ?	LEVD-X (W/L)EHD-X	+	11q22
Caspaza 5 $ICE_{rel}III$ Ty	- (W/L) EHD-X	- (W/L)EHD-X	+	11q22
Caspaza 6 Mch2	DVVD/N TEVD/A TETD/A	VEID-N VEHD-X	+	4q25
Caspaza 7 Mch3, CMH-1, ICE-LAP3	IQAD/S - DSVD/A	DEVD-X DEVD-X	+	10q25
Caspaza 8 Mch5, FLICE, MACH	VETD/S LEMD/L REQD/S	IETD-X LETD-X	+	2q33
Caspaza 9 Mch6, ICE-LAP6	PEPD/A DQLD/A ?	- LEHD-X	+	1q34
Caspaza 10 Mch4,	IEAD/A -	IEAD-X	+	2q33

FLICE – 2	SQTD/V			
Caspaza 11	?		+	
Caspaza 12	?		+	
Caspaza 13 ERICE	?		+	
Caspaza 14 Viz	?		+	

Prodomeniile se pare că joacă un rol în interacțiunea proteine-proteine. Astfel, prodomeniile caspazelor 8 şi 10 conțin domeniile efectorilor morții celulare (**DEDs** - *Death Effector Domains*) care sunt structuri ce permit legarea caspazelor la moleculele adaptatoare FADD (*Chinnaiyan, A. N. et al.* – 1995), sau TRADD (*Hsu, H. et al.* 1995).

Alte caspaze - 1, 2, 4 şi 9 - conțin un domeniu de activare şi inhibare al caspazelor (*Caspase Activation and Recruitment Domain:* **CARD**) (*Hofmann, K. et al.* – 1997) (fig. 14).

Proenzimele caspazelor pot fi activate de către AIF (*apoptosis inducing factor*), care se eliberează din mitocondrie prin permeabilizarea membranei acesteia. Semnalul apoptotic transmis prin activarea caspazelor poate fi dereglat de către supresorii apoptozei, cum este IAP (*inhibitor of apoptosis*). Caspazele sunt cele mai importante molecule care induc apoptoza. Cele mai importante caspaze implicate in apoptoză includ caspaza 2, caspaza 7, caspaza 8 şi caspaza 10. Familia caspazelor se împarte în două mari subfamilii: caspazele 1, 4 şi 5 intervin în maturarea citokinelor, a interleukinei 1- B şi a interleukinei 18 şi au funcție proinflamatorie. (*Păunescu V.* - 2006).

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

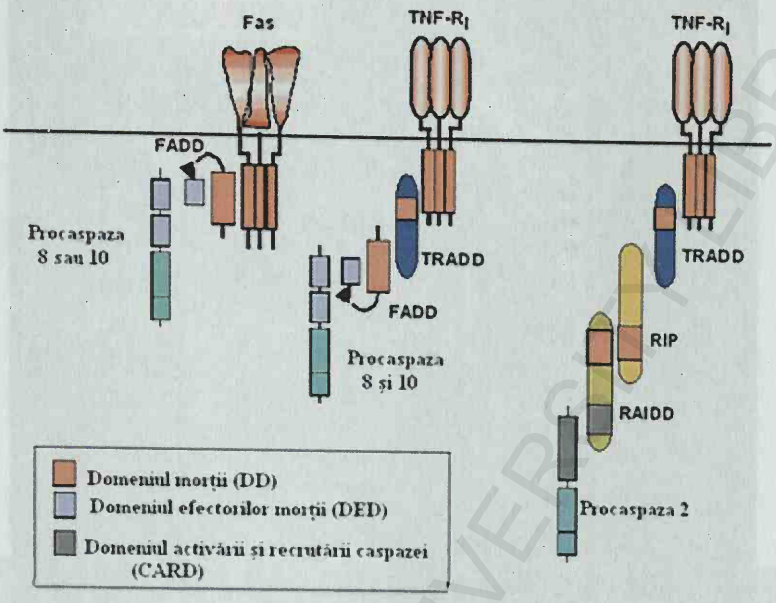
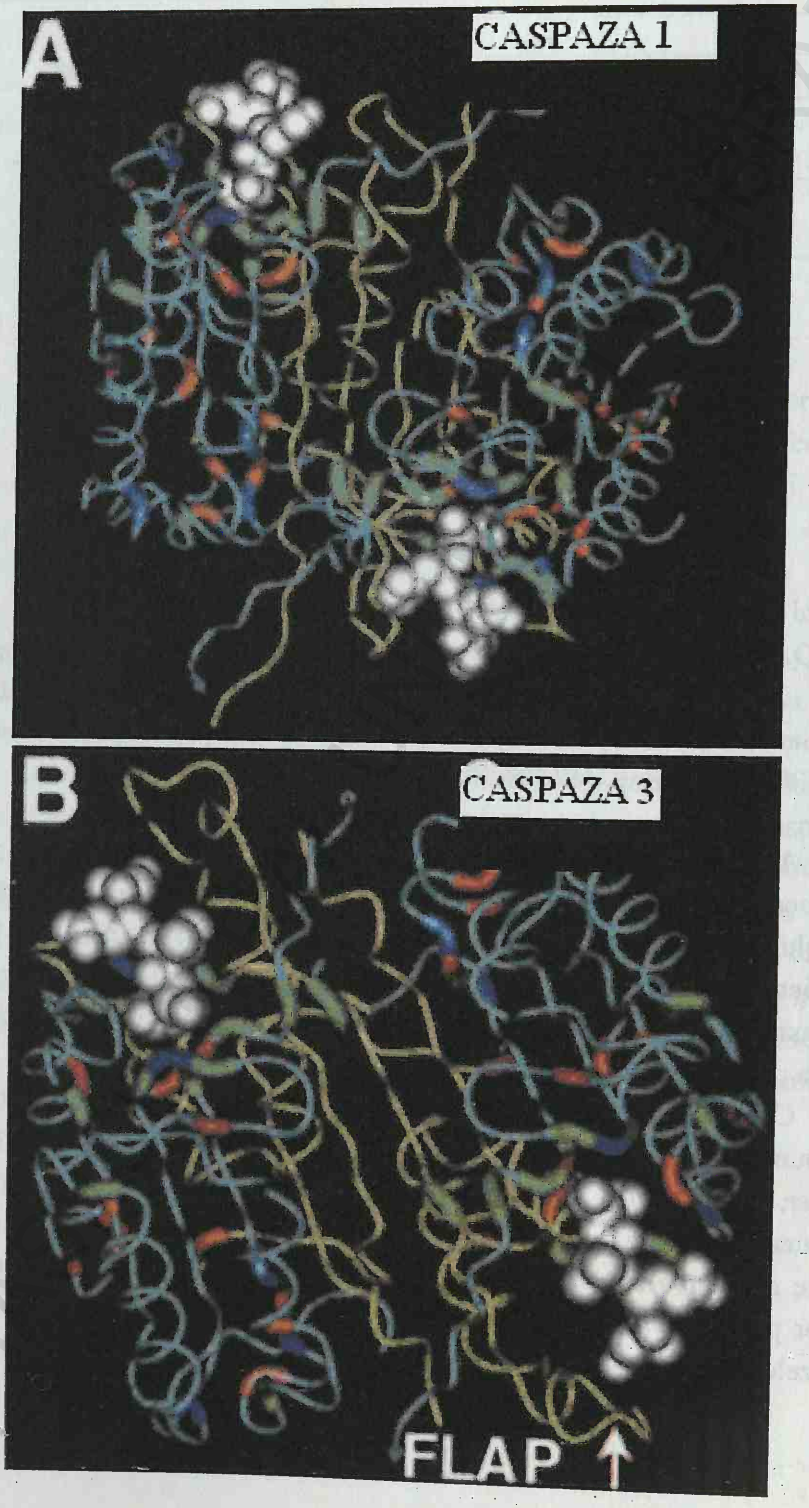


Fig. 14. Activarea caspazelor de către receptorii morţii (Fas şi TNF-RI) pot recruta caspazele în trei maniere distincte implicând interacţiunea cu domeniile morţii - DD, domeniile efectorilor morţii - DED sau domeniile de recrutare a caspazelor – CARD (Razthmell R. et al. 1999).

Activarea caspazelor. Conversia caspazelor de la stadiul de zimogene (proenzime inactive) într-o enzimă matură necesită cel puţin două clivări la nivelul legăturii Asp-X (tabelul III a). Aceste clivări succesive au loc într-o manieră secvenţială: mai întâi scindarea între subunitatea mare şi cea mică (deci există o eliberare a subunităţii mici de restul moleculei) urmată de eliberarea prodomeniului (fig. 15).

Caspaza va putea grupa în forma sa activă două subunităţi mari şi două subunităţi mici. Structura generală astfel obţinută va fi de tipul $(p10/p20)_2$ (*Walker, N. P. et al.* - 1994). Caspazele se vor putea activa autocatalitic sau vor putea fi activate de către alte caspaze, acest fenomen fiind cunoscut sub numele de ***activare în cascadă***. Astfel, odată caspazele iniţiatoare activate, ele vor putea cliva alte procaspaze încă în stadiul de zymogene (în special caspazele efectoare).


A
CASPAZA 1
B
CASPAZA 3
FLAP

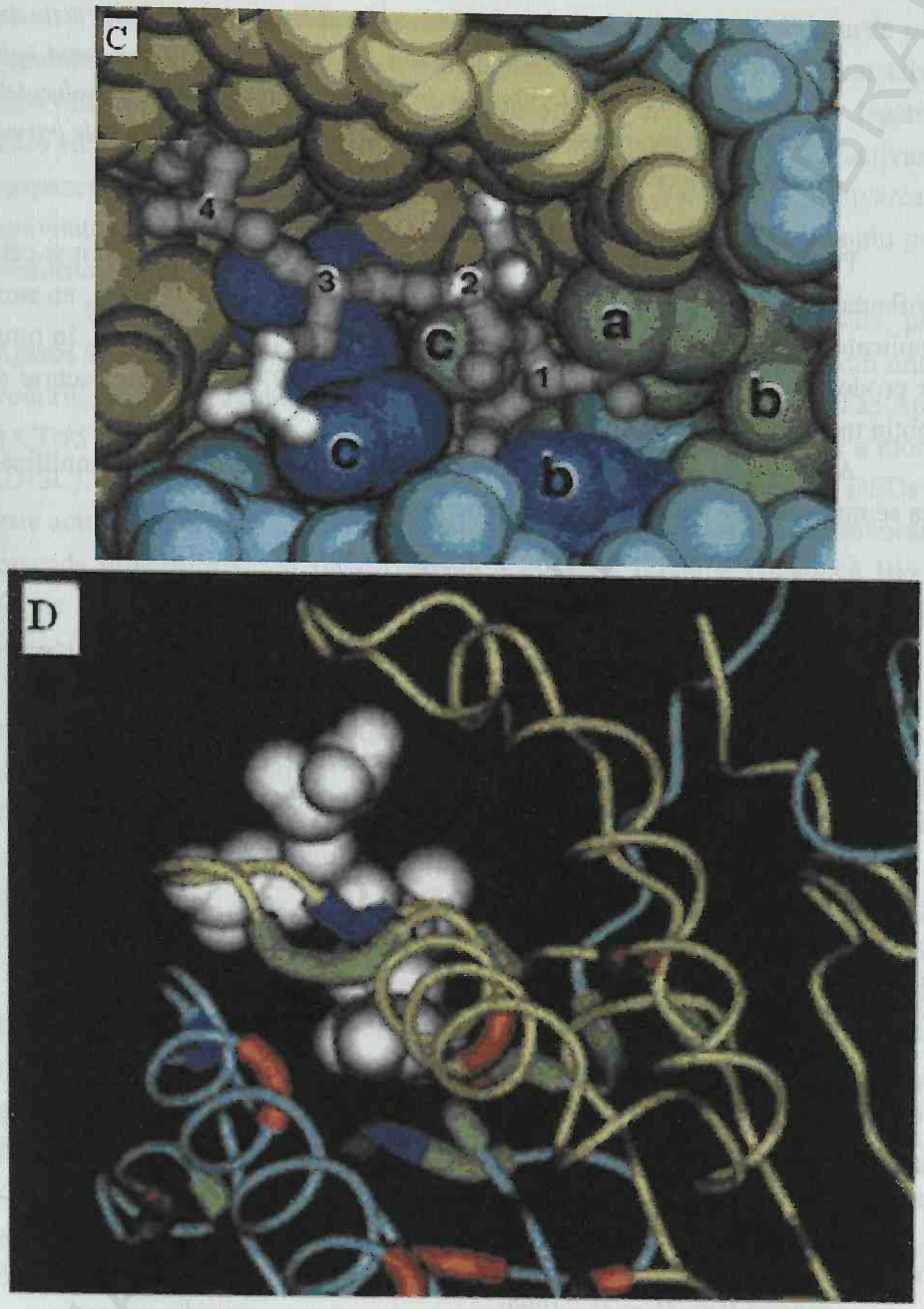


Fig. 15. Structura tridimensională a caspazelor. Scheletul hidrocarbonat al caspazelor 1 (A) şi 3(B). Substatele YVAD (A) şi DEVD (B) sunt reprezentate în alb la nivelul centrului activ. C – substratele caspazei: a - Cys_{285} (verde); b – His_{237} (bleu), Gly_{238} (verde); c – Gln_{283} (verde), Arg_{341} (bleu), iar carbonii aminoacizilor P_1, P_2, P_3 şi P_4 ai substratului DEVD sunt

BCU LIBRARY

numerotati de la 1 la 4. D – Acelasi substrat la nivelul centrului activ dar văzut dintr-o orientare opusă celei din 3C; resturile conservate sunt indicate numai după codul culorilor următoare: verde – pentru moleculele polare încărcate, orange pentru cele hidrofobe, bleu – pentru cele bazice, roşu – pentru cele acide (adaptat de Earnshaw şi colab., 1999)

Procaspazele iniţiatoare (procaspazele 2, 8, 9,10 şi 12) precum şi cele „inflamatorii" (peocaspazele 1, 4, 5, 11 şi 13 care, cu câteva excepţii, nu sunt implicate în apoptoză) conţin prodomenii de până la 100 aminoacizi, în timp ce prodomeniile caspazelor efectoare (procaspazele 3, 6 şi 7) sunt scurte şi conţin mai puţin de 20 aminoacizi (*Earnshaw, W. C. et al.* – 1999).

Acest tip de activare în cascadă permite probabil reglarea şi amplificarea semnalului, iar fenomenele ce au loc pot fi împărţite în trei etape:

- o etapă de induce care este reversibilă;
- o etapă de execuţie care este reglabilă;
- o etapă de degradare care este ireversibilă. (fig. 16).

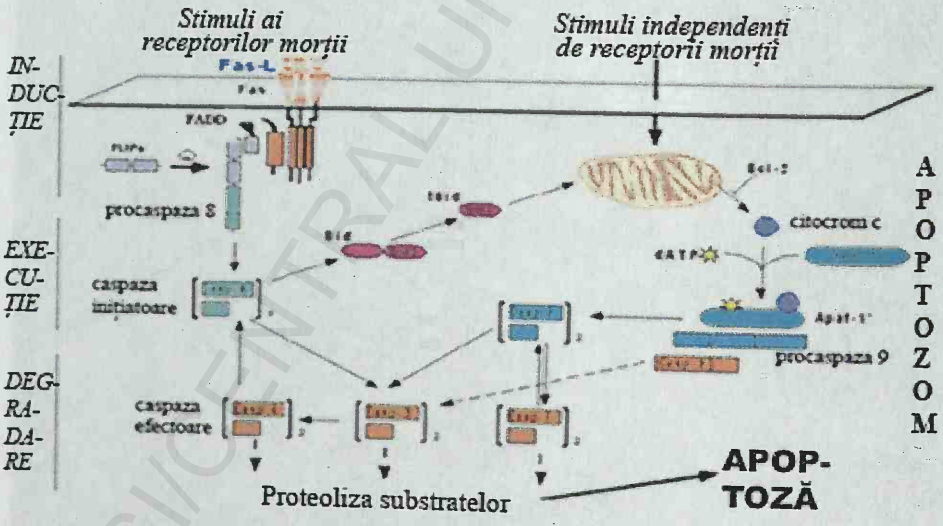


Fig. 16. Mecanismele moleculare ale apoptozei - principalele căi care conduc la apoptoză (Los, H. et al. - 1999)

Anumite studii au descris posibilitatea ca subunitatea p10 provenită din zimogene să se asocieze cu subunitatea p20 a unei alte zimogene în timpul maturării precursorilor (*Walker et al.* 1994; *Wilson et al.* 1994; *Rotonda*

et al., 1996). Unele proteaze neavând specificitatea pentru acid aspartic sunt capabile să activeze zimogenele caspazelor mai puțin *in vitro*. Acest clivaj intervine la nivelul situsurilor alternative situate în segmentul de legătură între subunitatea mare și cea mică; în plus a fost descris faptul că activarea caspazei 9 se poate face fără clivaj (*Stennicke, H. R. et al.* 1997). Activarea și activitatea caspazelor poate fi modulată în diferite moduri (de exemplu prin fosforilare).

Există două căi intracelulare prin care caspazele pot fi activate: prin liganzi ai receporilor morții sau prin eliberarea factorilor apoptotici din mitocondrii. Astfel, legătura dintre unii receptori cum ar fi TNF sau Fas/Apo-1/CD95 are drept consecință ansamblul complexului de semnalizare a morții (DISC). Procaspaza 8 este captată de DISC după interacțiunea cu DEDs și este activată. Caspaza 8 activă activează la rândul ei procaspaza 3, provocând cascada proteolitică. În plus, caspaza 8 clivează proteina citosolică Bid și forma sa transferată *tBid* în mitocondrii și induce detașarea citocromului c (*Gross si colab.*, 1999).

În marea majoritate a modelelor apoptotice, caspazele sunt activate în aval de detașarea mitocondrială a citocromului c și a altor proteine în spațiul intramembranar, interesând AIF, proteinele HSPs, proteina legată direct de IAP cu activatorul mitocondial al caspazelor DIABLO/SMAC, adenilat kinaza-2 (Ak-2) și multe procaspaze. După intrarea în citosol, citocromul c se leagă de Apaf-1 care oligomerizează în prezența dATP/ATP și leagă procaspaza 9 pentru a forma complexul apoptozomic

Caspazele sunt enzime extrem de selective. Astfel, analiza pe un gel bidimensional a unui extract obținut din celule vii și celule în apoptoză nu a relevat decât mici modificări în profilul global. Proteinele țintă trebuie să posede neapărat un rest aspartat în poziția P1. Acest rest de acid aspartic va fi pus într-un *„buzunar"* (denumit site-ul S1) și va fi astfel aliniat cu Arg_{179}, Gln_{283}, Arg_{341} și Ser_{347} (numerotațiile corespunzând caspazei 1). Această structură este conservată la toate caspazele umane (cu excepția restului Ser_{347} care este înlocuit de *Thr* în caspaza 8) (fig. 15).

Caspazele diferă în funcție de specificitatea lor de substrat și pot fi divizate în trei subgrupe în funcție de ordinea tetrapeptidelor (P4-P1), iar enzimele activate clivează substratele respective. Situsul P4 (patru aminoacizi N-terminali situați la nivelul situsului de acțiune) este cauza determinantă a specificității de substrat.

Datorită numărului mare de caspaze precum şi datorită absenţei inhibitorului strict selectiv al unei caspaze date, implicarea individuală a acestor proteaze apoptogene în moartea celulară programată n-a putut fi studiat până în prezent, generând la animale deficienţe pentru expresia unora dintre ele. În acest moment, singurele gene ce codifică caspazele 1, 2, 3, 8, 9, 11 şi 12 au fost invalide (tabbelul IV).

Tabelul IV

Expresia genică a unor caspaze

	Dezvoltarea şi expresia citochinelor	**Apoptoza**	**Bibliografie**
Caspaza 1	Nu au efect asupra dezvoltării, Rezistenţă la şocurile septice induse de LPS	Sensibilitate normală la majoritatea agenţilor proapoptotici; Apoptoza indusă de către CD 95 este atenuată în timocite.	*Kuida et al., 1995* *Wang et al., 1998*
Caspaza 2	Viabilă, fără probleme majore Exces în celulele germinale femele	Ovocite rezistente la moartea indusă de către droguri; Moartea indusă de către grazima B este defectuasă în celulele B; Limfocitele sunt sensibile la droguri.	*Bergeron et al., 1998*
Caspaza 3	Talie foarte mică; Durata de viaţă între prima şi a treia săptămână; Alterarea dezvoltării creierului cu un exces de celule postmitotice.	Nu există înmuguriri şi fragmentări ale nucleului în timocite şi hepatocite; Clivajul substratelor caspazelor este absent sau întârziat.	*Kuida et al., 1996* *Woo et al., 1998*
Caspaza 8	Letală în uter; Embrioni foarte mici; Malformaţii	Fibroplastele rezistente apoptozei induse de către TNF- R_L, CD95 şi DR 3	*Varfolomeev et al., 1998*

	cardiace; Acumulări massive de eritrocite şi hemoragii intense; Diminuarea celulelor suşe hematopoetice.	dar sensibile la marea majoritate a agenților proapoptotici	
Caspaza 9	Letalitate perinatală; Absența activării caspazei 3 în creierul embrionilor	Celulele suşe embrionare şi fibroplastele sunt rezistente la numeroşi stimuli proapoptotici; timocitele sunt rezistente la apoptoza indusă prin radiații γ şi dexametazone dar sensibile la UV	*Hakem et al., 1998 Kuida et al., 1998*
Caspaza 11	Nu are efect asupra dezvoltării (similar caspazei 1)	Celulele rezistente la apoptoza indusă de caspaza 1	*Wang et al., 1998*
Caspaza 12	Nu are efect asupra dezvoltării	Neuronii corticali prezintă o insensibilitate la apoptoza indusă de către proteina β-amiloid	*Nakagawa et al., 2000*

Rolul caspazelor nu pare a fi restrâns doar la apoptoză (tabelul V). De fapt s-a demonstrat că unele caspaze (1, 4, 5 şi 11) contribuie la maturarea citokinelor – de exemplu interleukina 1b – în cursul proceselor inflamatorii. Cercetările recente sugerează faptul că nu toate caspazele sunt indispensabile declanşării apoptozei ci pot avea şi alte funcții, de exemplu pot activa la rândul lor alte caspaze în celulele care nu au intrat în apoptoză. Există şi caspaze independente dar majoritatea modelelor apoptotice implică activarea caspazelor.

Până în momentul de față nu s-a găsit implicarea unei caspaze în necroză, iar inactivarea acesteia poate reprezenta un stadiu intermediar de la

apoptoză la necroză. Detectarea momentului de activare al caspazelor reprezintă un criteriu care face distincție între apoptoză și necroză.

Tabelul V

Principalele funcții ale caspazelor

	Dezvoltarea și expresia citochinelor	**Apoptoza**	**Bibliografie**
Caspaza 1	Nu au efect asupra dezvoltării. Rezistență la șocurile septice induse de LPS	Sensibilitate normală la majoritatea agenților proapoptotici; Apoptoza indusă de către CD 95 este atenuată în timocite.	*Kuida et al., 1995* *Wang et al., 1998*
Caspaza 2	Viabilă, fără probleme majore Exces în celulele germinale femele	Ovocite rezistente la moartea indusă de către droguri; Moartea indusă de către grazima B este defectuasă în celulele B; Limfocitele sunt sensibile la droguri.	*Bergeron et al., 1998*
Caspaza 3	Talie foarte mică; Durata de viață între prima și a treia săptămână; Alterarea dezvoltării creierului cu un exces de celule postmitotice.	Nu există înmuguriri și fragmentări ale nucleului în timocite și hepatocite; Clivajul substratelor caspazelor este absent sau întârziat.	*Kuida et al., 1996* *Woo et al., 1998*
Caspaza 8	Letală în uter; Embrioni foarte mici; Malformații cardiace; Acumulări massive de eritrocite și hemo-	Fibroplastele rezistente apoptozei induse de către TNF- R_L, CD95 și DR 3 dar sensibile la marea majoritate a agenților proapoptotici	*Varfolomeev et al., 1998*

	ragii intense; Diminuarea celulelor suşe hematopoetice.		
Caspaza 9	Letalitate perinatală; Absenţa activării caspazei 3 în creierul embrionilor	Celulele suşe embrionare şi fibroplastele sunt rezistente la numeroşi stimuli proapoptotici; timocitele sunt rezistente la apoptoza indusă prin radiaţii γ şi dexametazone dar sensibile la UV	*Hakem et al., 1998* *Kuida et al., 1998*
Caspaza 11	Nu are efect asupra dezvoltării (similar caspazei 1)	Celulele rezistente la apoptoza indusă de caspaza 1	*Wang et al., 1998*
Caspaza 12	Nu are efect asupra dezvoltării	Neuronii corticali prezintă o insensibilitate la apoptoza indusă de către proteina β-amiloid	*Nakagawa et al., 2000*

În ceea ce priveşte mecanismul molecular al apoptozei, studiile au arătat că CED-4 ar putea interacţiona simultan cu CED-3 şi CED-9 iar atunci ar fi exprimat în celulele mamiferelor şi s-ar localiza pe membrana mitocondrială în prezenţa unei molecule Bcl-2 (*Chinnaiyan et al. 1997*); în plus, a fost posibilă izolarea complexului Bcl-XL/CED-4/caspază. S-a dovedit că localizarea complexului pe membrana mitocondrială are efect inhibitor asupra apoptozei, chiar dacă eliberarea de CED-4 în citoplasmă antrenează activarea caspazelor şi moartea celulară.

Datorită unui sistem acelular de studiu al activării caspazelor, *Li P.* şi colab., 1997 au identificat un complex proteic indispensabil de maturaţie proteolitică a acestei caspaze precum şi activarea sa. Acest complex este alcătuit din: Apaf-1, citocrom c (Apaf-2) şi caspaza 9 (Apaf-3). Apaf-1 este dovedit

că este indispensabilă activării caspazei 9. Acțiunea Apaf-1 necesită prezența absolută a citocromului c și dATP. De fapt dATP permite schimbarea conformației Apaf-1 în așa fel încât poate lega citocromul c eliberat de mitocondrie. Acest precomplex poate apoi recruta procaspaza 9 și astfel se produce activarea sa. Complexul multimolecular astfel format este numit ***apoptozom*** (fig. 16).

Studii recente au arătat că activarea procaspazei 3 este dependentă de captarea sa în apoptozom și nu este deci un eveniment citoplasmatic determinat de eliberarea caspazei 9 active. Apaf-1 poate, de asemenea, interacționa cu alte proteine, cum ar fi Bcl-XL și caspazele 4 și 8, iar interacțiunea dintre Apaf-1 și Bcl-XL se face, în principal, prin domeniul BH4 al Bcl-XL. Acestea conduc la inhibiția asociației Apaf-1/caspaza 9 și, drept urmare, la absența activării acestei caspaze.

Numeroși stimuli sunt capabili să inducă apoptoza. Există totuși o familie de receptori specializați în inducerea morții celulare programate - ***receptorii morții.*** Odată stimulați, aceștii receptori induc activarea caspazelor. Această cale de activare este implicată în eliminarea celulelor potențial periculoase pentru organism cum ar fi limfocitele autoreactive. Receptorii morții aparțin unei familii de receptori cunoscuți sub numele de ***factori necrotici ai tumorilor*** (TNF-R (tabelul VI).

Tabelul VI

Factori necrotici ai tumorilor (TNF-R)*

Receptor	Masă Moleculară (kDa)	Nb aa	Nb Domenii bogate în ciseină	Domenii ale morții celulare (DD)	Expresia
LNGFR/p75	75	427	4	Da	Celule B (dar nu monocite sau celule T), măduvă osoasă, celule Schwann, etc.
CD40	50	277	3 sau 4	Nu	Celule B, monocite și bazofile, eozinofile,

					celule endoteliale, celule Langerhans, Sarcomul Kaposi, etc.
CD137-4-1BB/ILA	30-35	255	Variabil	Nu	Fibroplaste, timocite, monocite, LTc CD_4 şi CD_8.
TNFR1/ P55/ CD120a	55	455	4	Da	Toate celulele mamiferelor în special hepatocitele, monocitele, neutrofilele, etc.
TNFR2/ p75/ CD120b	75	461	4	Nu	Monocitele, celulele endoteliale, celulele Langerhans şi macrofagele
CD134/ OX40/ ACT35	48	250			Foarte restrîns: LT CD_4^+ şi CD_8^+
CD27	50-55	242		Nu	Celulele NK, B, timocite leşi LT CD_4^+ şi CD_8^+
Fas/ Apo-1/ CD95	43	255	3	Da	Celulele NK, B, timocitele şi LT CD_4^+ şi CD_8^+, eozinofilele, hepatocite, etc.
CD30/ Ki 1	105-120	577	6		Celulele Red-Sternberg şi LT CD_4^+ şi CD_8^+

* *Nagata, Y. et al. - 1997*

TNF-R pot provoca, după caz, fie supravieţuirea, fie moartea. Receptorii CD27, CD30, CD40, TNF-RII, Ox40, 4-1BB şi 75 NGFR sunt implicaţi în supravieţuirea celulară. Printre membrii familiei implicaţi în moartea celulară, putem cita CD95 (Fas/APO-1), TNF-RI, DR3, DR4 şi DR5.

Moartea indusă de membrii familiei TNF-R conduce la activarea caspazelor, iar membrii familiei TNF-R sunt proteine transmembranare de tip 1 care posedă în domeniul lor extracelular de la 1 la 6 regiuni bogate în

BCU "ALEXANDRU IOAN CUZA" CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

cisteină, implicate în legarea de ligant (tabelul VI). Receptorii morții posedă în partea lor intracelulară o regiune de aproximativ 80 aminoacizi denumită domeniul morții celulare (**DD**) care a fost conservat în cursul evoluției. Astfel, un domeniu omolog a fost regăsit în gena *Reaper* la *Drosophila.*

Gena *Reaper* este implicată în reglarea morții celulare programate în cursul embriogenezei normale la *Drosophila.* Receptorul Fas (CD95/APO-1) este un receptor Fas ligand (FasL), care reprezintă prototipul receptorilor morții. El se manifestă la suprafața numeroaselor tipuri celulare. Stimularea Fas prin ligantul său fiziologic, sau prin anticorpii anti-Fas, induce oligomerizarea sa şi recrutare prin intermediul domeniului morții celulare a unui anumit număr de proteine implicate în transducția semnalului apoptotic.

Apoptoza mediată prin Fas Fas şi TNF-RI, nu a fost modificată de prezența inhibitorilor biosintezei ARN-ului sau a proteinelor (*Itoh, J. at al.* – 1991). În plus celulele anucleate pot angrena un program de moarte celulară după stimularea receptorilor Fas . Acestea sugerează că diferiții promotori necesari inducerii apoptozei sunt constitutivi prezenți şi că activarea receptorilor prin liganții săi nu face decât să inducă asocierea proteinelro preexistente necesare transmiterii semnalului apoptotic.

Cuplul Fas/FasL, pentru acelaşi motiv cu perechea granzimă B/perforină joacă un rol preponderent în citotoxicitatea limfocitelor T (LTc). Aceste două mecanisme cooperează pentru a permite eliminarea celulelor țintă printr-un proces de apoptoză. În cazul cuplului grazimă B/perforină, perforina eliberată la interfața între LTc şi celula țintă formează un canal care permite grazimei B, o serin-protează care posedă o specificitate de clivare identică celei a caspazelor, mai exact are capacitatea de a penetra in celula țintă în scopul de a activa direct caspazele efectoare şi de a induce apoptoza.

Liganzii. Din familia liganzilor TNF fac parte TNF, FasL, CD30L, TRAIL, Lymphotoxine etc. (tabelul VII).

BCU IAŞI - CENTRUL UNIVERSITAR

Tabelul VII

*Principalii reprezentanți ai familiei liganzilor TNF**

Receptor	Observatii
LNGFR/p75	Formă activă: homodimer conținând o punte S-S (P.M. 200 kDa). Nu are activitate tirozin-kinazică în comparație cu Trks. Formă solubilă produsă prin proteoliză.
CD40	Adesea asociată la proliferarea şi la diferențierea celulară. Stimularea CD40, induce apoptoza. Aceasta nu este dată de intervenția unui domeniu a morții. Semnalizarea prin CD40 implică activarea NF-kB. Există sub formă solubilă de CD40.
CD137/4-1BB/ILA	Mono sau homodimer. Stimularea CD137 este capabilă de a întrerupe apoptoza.
TNFR1/P55/CD120a	Inducerea apoptozei sau proliferarea (NF-kB) după condiții. TNF α şi β pot lega TNFR1. Forma solubilă a TNFR1 este produsă prin proteoliză (cel puțin 2 forme de 32 şi 48 KDa).
TNFR2/p75/CD120b	Poate limita răspunsul TNFR1 în liant TNFα. Forma solubilă este produsă de către TRRE (TNF – *receptor releasing enzyme*).
CD134/OX40/ACT35	
CD27	Homodimer la suprafața celulară. Poate induce apoptoza datorită unui receptor asociat.
FAS/Apo-1/CD95	Fas poate induce fie proliferarea, fie apoptoza pe fibroplaste (aceasta depinde de cantitatea de

	molecule exprimate). Fas solubil; este produs prin legare alternativ
CD30/Ki 1	Celulele T CD $30^{+}CD_4^{+}$ sunt considerate ca fiind celule producătoare de IL-5.

* *Nagata & Golstein -1995*

Aceşti liganzi sunt în marea majoritate, proteine transmembranare de tip II iar domeniul extracelular este compus din aproximativ 150 aminoacizi. Unele din aceste proteine, ca de exemplu FasL şi TNF, există egal sub formă solubilă.

Forma solubilă este obţinută prin proteoliză indusă de către o familie de metaloproteaze membranare. Numeroase studii au raportat că stresul celular poate induce expresia liganţilor morţii, ca FasL şi deci induc apoptoza.

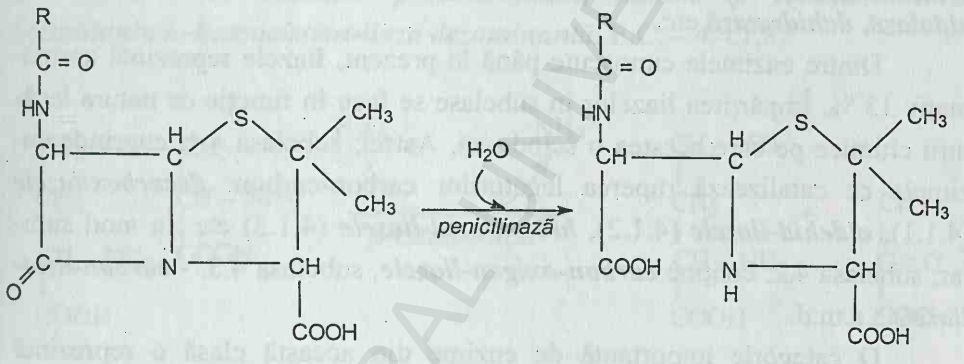
Receptorii apoptozei – mecanismul de activare a receptorilor Fas. Odată stimulat de către ligandul său specific, Fas trimerizează şi leagă o proteină adaptatoare FADD/MORT1 (fig. 14). FADD prezintă particularitatea de a poseda, în afară de domeniul morţii (DD) şi un domeniu al morţii celulare (**DED**). Acesta din urma este necesar şi suficient pentru a induce apoptoza. Transfecţia unui modul DED, ca *Reaper* de exemplu, este suficientă pentru a induce apoptoza în celulele eucariote. În anumite condiţii, TNF-RI interacţionează ci FADD, dar acest cuplaj este totuşi indirect şi se face prin intermediul unei proteine conţinând un DD : **TRADD** (fig. 14). Astfel, FADD reprezintă punctul de convergenţă a căii de semnalizare indusă de către FAS sau TNF-RI. În consecinţă, FADD poate recruta caspaza 8 sau caspaza 10 prin intermediul DED şi astfel iniţiază cascade apoptotice.

Importanţa FADD şi rolul său central în apoptoză au fost clarificate prin studiul şoarecilor, aceste studii sugerând că există o conexiune îngustă între proliferarea celulară şi apoptoză. Astfel, semnalizarea prin FADD nu va duce exclusiv la moartea celulară ci, în anumite circumstanţe, la supravieţuire şi proliferare. TRADD se poate lega la nivelul domeniului morţii DD de TNF-RI şi este capabil să inducă activarea NF-kB. TRADD activ este capabil să lege o proteină adaptoare suplimentară (TRAF2 sau FADD). Legarea proteinei TRAF2 determină activarea NH-kB şi SPAK în tiomp ce legarea proteinei FADD determină activarea caspazelor. În felul acesta, TRADD poate interacţiona cu DD al RIP, o serin-treonin kinază care poate induce, în funcţie de circumstanţe, fie activarea lui NK-kB, fie apoptoza.

RIP este, de asemenea, asociat cu Fas, iar RIP interacționează cu RAIDD care, la rândul său, interacționează cu caspaza 2 dar nu și cu caspazele 1,3,4,6,7 și 9 (fig. 14).

În concluzie, se poate afirma că moleculele asociate receptorilor morții induc activarea caspazelor prin intermediul domeniilor DD, DED sau CARD în urma unor interacțiuni de tipul FADD/caspază 8 sau 10, TRADD/FADD/caspază 8 sau 10 și respectiv TRADD/RIP/RAID/caspază 2 (fig. 16).

O hidrolază foarte importantă din punct de vedere practic este ***penicilinaza***, numită și ***β-lactamază*** sau ***cefalosporinază (β-lactamhidrolaza***, E.C. – 3.5.2.6) ce catalizează reacția de hidroliză a penicilinei cu formare de acid penicilanic:



penicilina G acid penicilanic

Importanța practică a acestei enzime constă în utilizarea sa în procesele tehnologice de obținere a penicilinelor de semisinteză. Biosinteza acesteia la multe microorganisme patogene este indusă în tratamentele îndelungate cu penicilină. Pentru creșterea eficienței terapeutice se apelează la noi peniciline de semisinteză care nu pot fi recunoscute de penicilinază, iar obținerea acestora se face prin utilizarea în calitate de precursor a acidului penicilanic.

Penicilina clasică poate fi hidrolizată și de o altă enzimă numită ***penicilin-amidază*** (***penicilin amidohidrolaza***, EC 3.5.1.11) sub acțiunea căreia trece în acid 6-aminopenicilanic.

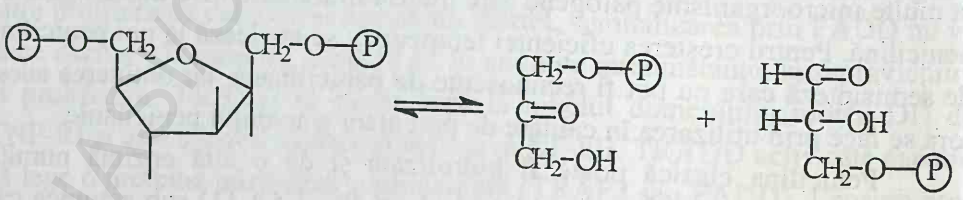
BCU/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

II.2.3.4 Caracterizarea clasei liazelor

Din această clasă fac parte enzimele ce catalizează reacții de rupere a unor legături carbon-carbon sau carbon-heteroatom din molecula substratului, fără participarea apei, cu rearanjarea ulterioară a valențelor. Pentru majoritatea enzimelor din această clasă, denumirea sistemică se face prin adăugarea termenului ***liaza*** la numele substratului asupra căruia acționează enzima respectivă. Atunci când reacția inversă este mai importantă din punct de vedere metabolic, sau atunci când s-a demonstrat doar existența acesteia, se poate utiliza și denumirea de ***sintază*** (dar nu ***sintetază***). Pentru liazele ce catalizează unele reacții particulare, sunt utilizate denumirile triviale: ***decarboxilază, aldolază, dehidratază*** etc.

Dintre enzimele cunoscute până în prezent, liazele reprezintă aproximativ 13 %. Împărțirea liazelor în subclase se face în funcție de natura legăturii chimice pe care acestea o scindează. Astfel, subclasa 4.1. cuprinde enzimele ce catalizează ruperea legăturilor carbon-carbon: ***decarboxilazele*** (4.1.1), ***aldehid-liazele*** (4.1.2), ***hidroxiacid-liazele*** (4.1.3) etc. În mod similar, subclasa 4.2. conține ***carbon-oxigen-liazele***, subclasa 4.3. - ***carbon-azot-liazele*** ș.a.m.d.

O categorie importantă de enzime din această clasă o reprezintă ***aldolazele***, enzime ce catalizează diferite reacții de condensare aldolică. Astfel, ***fructozo-difosfat-aldolaza***, a cărei denumire sistemică este ***D-fructozo – 1 , 6 – difosfat – D – gliceraldehid – 3 – fosfat - liaza (EC 4.1.2.13)*** catalizează o reacție importantă a căii glicolitice și a fotosintezei:

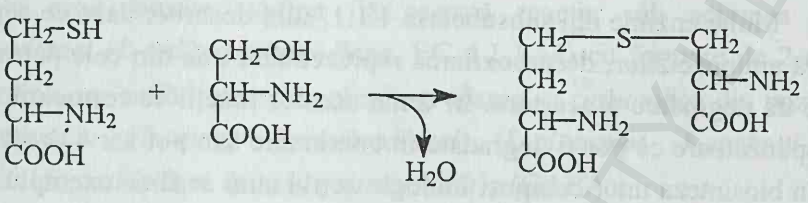


D-frutozo-1,6-difosfat

dihidroxi-acetonfosfat

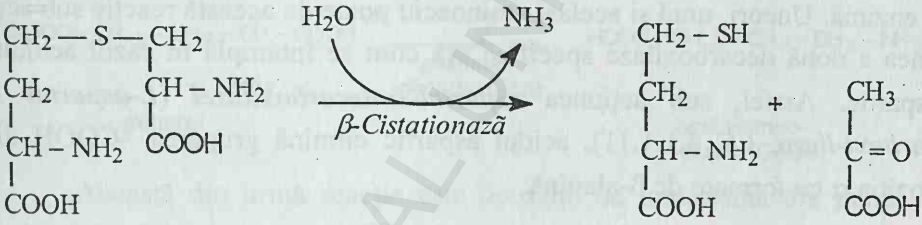
D-gliceraldehid-fosfat

În metabolismul tioaminoacizilor intervine o liază piridoxalfosfat-dependentă ce participă la condensarea homocisteinei cu serina. Această reacție este catalizată de ***cistein-liază*** sau ***cistationin-α-sintază*** (E.C.-4.2.1.22.):



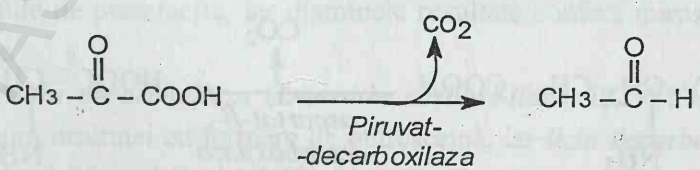
homocisteină serină L-cistationină

La rândul său, cistationina este descompusă în homocisteină, piruvat şi amoniac sub acțiunea ***β-cistationazei***, numită şi ***cistationin-liază*** (***cistationin L-homocistein-liaza dezaminantă***, E.C. – 4.4.1.8):



cistationină homocisteină piruvat

Foarte importante din punct de vedere metabolic sunt reacțiile de decarboxilare, reacții în care se elimină o moleculă de CO_2 din aminoacizi, acizi carboxilici etc. De exemplu, decarboxilarea neoxidativă a acidului piruvic cu formare de acetaldehidă are loc sub acțiunea ***piruvat decarboxilazei***, numită şi ***α-cetoacid decarboxilază (α-cetoacid carboxiliaza***, EC 4.1.1.1):



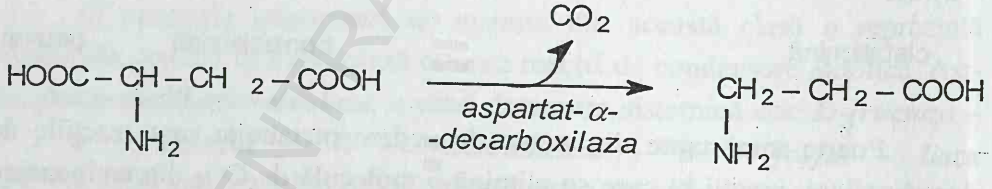
piruvat acetaldehidă

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Această enzimă prezintă o specificitate largă de substrat, în afară de piruvat putând decarboxila şi alţi α-cetoacizi. Ea conţine în calitate de cofactor tiaminpirofosfatul şi joacă un rol esenţial în metabolismul intermediar.

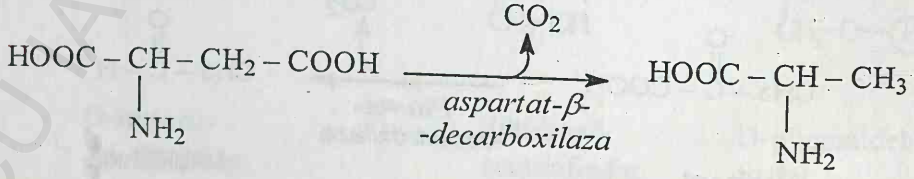
Multe enzime din subsubclasa 4.1.1. sunt decarboxilaze ce acţionează asupra aminoacizilor, decarboxilarea reprezentând una din cele patru căi comune de degradare a acestora. În urma acestor reacţii se formează aminele corespunzătoare ce pot fi degradate în continuare sau pot servi drept precursori în biosinteza unor compuşi biologic activi cum ar fi de exemplu alcaloizii. Multe amine formate prin decarboxilarea aminoacizilor îndeplinesc importante funcţii biochimice şi fiziologice. Din aceste motive, acestea au fost denumite ***amine biogene***.

Aminoacid-decarboxilazele sunt enzime înalt specifice şi se întâlnesc atât în organismele animale şi vegetale cât şi în microorganisme. Înalta lor specificitate de substrat face ca fiecare aminoacid să fie decarboxilat de câte o enzimă. Uneori, unul şi acelaşi aminoacid poate da această reacţie sub acţiunea a două decarboxilaze specifice aşa cum se întâmplă în cazul acidului aspartic. Astfel, sub acţiunea ***aspartat-α-decarboxilazei*** (***L-aspartat 1-carboxi-liaza***, EC 4.1.1.11), acidul aspartic elimină gruparea –COOH din poziţia α cu formare de β-alanină:



aspartat β-alaninã

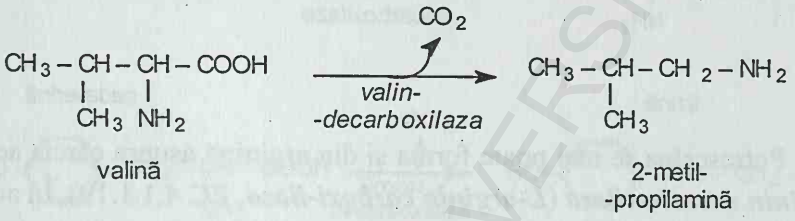
Acidul aspartic mai poate fi decarboxilat şi sub acţiunea ***aspartat β-decarboxilazei*** (***L-aspartat 4-carboxi-liaza***, EC 4.1.1.12) când este eliminată grupa –COOH din poziţia β cu formare de α-alanină:



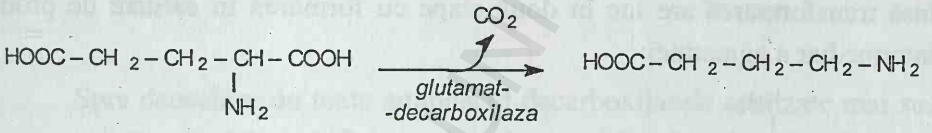
Aspartat α-Alaninã

Aceste reacții stau la baza principalelor căi de biosinteză a alaninei în organismele vii. Aspartat β-decarboxilaza conține piridoxalfosfatul în calitate de cofactor și are o specificitate de substrat ceva mai largă, putând acționa și asupra aminomalonatului.

În mod similar, valina dă această reacție sub acțiunea ***valin decarboxilazei*** (***L-valin carboxi-liaza***, EC 4.1.1.14) cu formare de 2-metil-propilamină, iar acidul glutamic pierde gruparea sa carboxilică din poziția α sub acțiunea ***glutamat decarboxilazei*** (***L-glutamat 1-carboxi-liaza***, EC 4.1.1.15) cu formare de acid γ-aminobutiric (GABA):



valină — 2-metil-propilamină

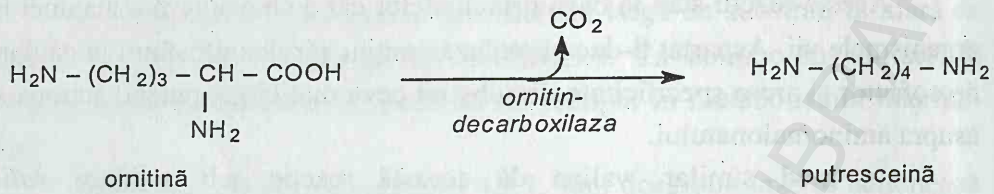


glutamat — acid γ-amino-butiric (GABA)

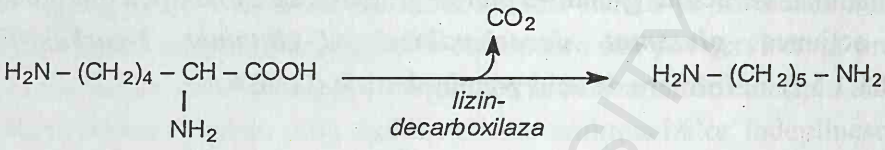
Această din urmă reacție este deosebit de importantă din punct de vedere fiziologic pentru organismele animale întrucât acidul γ-aminobutiric îndeplinește o importantă funcție de mediator chimic. Decarboxilazele ce acționează asupra valinei și acidului glutamic, ca de altfel toate aminoacid decarboxilazele, sunt enzime piridoxalfosfat-dependente.

Decarboxilarea aminoacizilor bazici este des întâlnită în toate organismele vii. *In vivo*, diaminele rezultate (cadaverina și putresceina) sunt utilizate la biosinteza de poliamine (cum ar fi de exemplu spermidina și spermina) ce îndeplinesc anumite funcții biochimice și fiziologice. Lizina și ornitina se decarboxilează cu mare viteză în cadavre, sub acțiunea enzimelor din bacteriile de putrefacție, iar diaminele rezultate conferă mirosul specific de cadavre.

Ornitin decarboxilaza (***L-ornitin carboxi-liaza***, EC 4.1.1.17) acționează asupra ornitinei cu formare de putresceină, iar ***lizin decarboxilaza*** (***L-lizin carboxi-liaza***, EC 4.1.1.18) decarboxilează lizina cu formare de cadaverină:

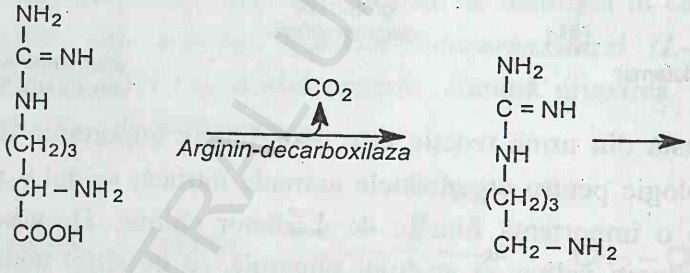


ornitină putresceină

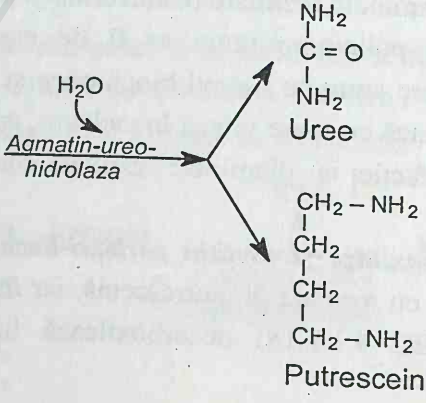


lizină cadaverină

Putresceina se mai poate forma şi din arginină asupra căreia acţionează ***arginin decarboxilaza*** (***L-arginin carboxi-liază***, EC 4.1.1.19). În acest caz însă transformarea are loc în două etape cu formarea în calitate de produs intermediar a agmatinei:

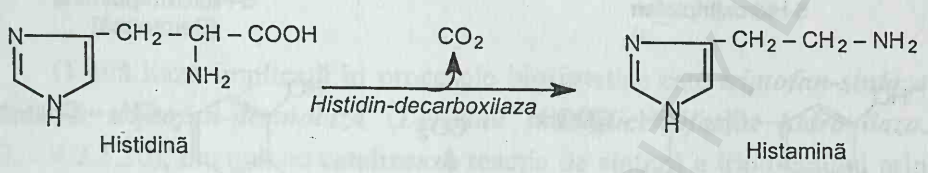


Arginină Agmatină

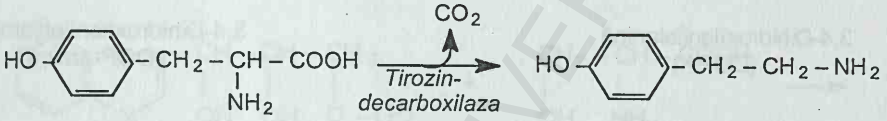


BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Două reacții extrem de importante prin rolul jucat de produșii rezultați sunt reacțiile de decarboxilare a histidinei și tirozinei. Ele sunt catalizate de ***histidin decarboxilază*** (***L-histidin carboxi-liaza***, EC 4.1.1.12) și respectiv ***tirozin decarboxilază*** (***L-tirozin carboxi-liaza***, EC 4.1.1.25) când se formează histamina și respectiv tiramina:

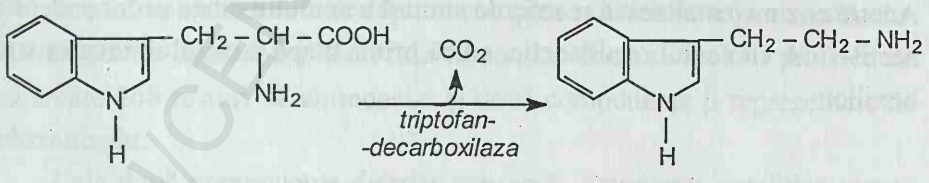


Histidină Histaminã



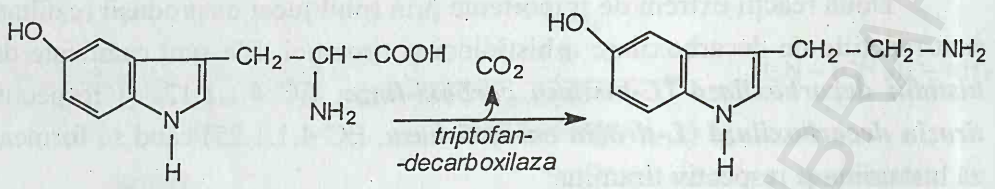
Tirozinã Tiraminã

Spre deosebire de toate aminoacid decarboxilazele analizate mai sus, care prezintă o înaltă specificitate de substrat, ***triptofan decarboxilaza*** (***L-aminoacid aromatic carboxi-liaza***, EC 4.1.1.28) are o specificitate mult mai largă. Ea poate acționa asupra triptofanului când se formează triptamina dar, în egală măsură, poate decarboxila și 5-hidroxi-triptofanul (cu formare de serotonină), precum și 3,4-dihidroxi-fenilalanina (DOPA) cu formare de DOP-amină:



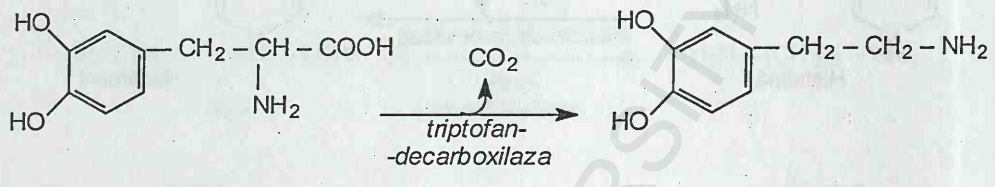
Triptofan Triptaminã

BCU IAȘI/CENTRUL UNIVERSITAR LIBRARY



5-Hidroxitriptofan

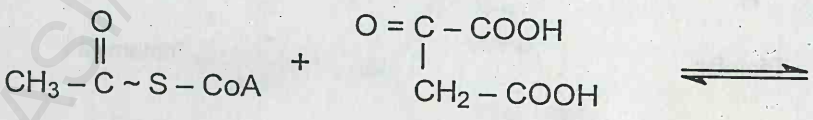
5-Hidroxitriptaminã
(Serototinã)



3,4-Dihidroxifenilalaninã
(DOPA)

3,4-Dihidroxifeniletilaminã
(DOP-aminã)

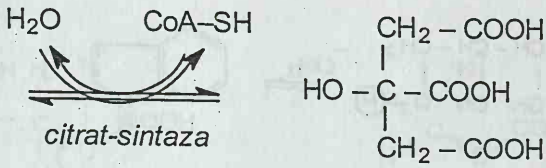
Liazele sunt implicate nu numai în procesele catabolice. Există numeroase enzime din clasa liazelor implicate în diferite procese de biosinteză. Un exemplu concret în acest sens îl reprezintă ***citrat sintaza*** (***citrat oxaloacetat-liaza***, EC 4.1.3.7), cunoscută şi sub alte denumiri: ***enzimă de condensare, citrogenaza, oxaloacetat-transacetaza*** etc. În ediția din 1992 a Nomenclatorului enzimelor elaborată de Uniunea Internațională de Biochimie şi Biologie Moleculară mai este inclusă şi o a doua citrat sintază cu aceeaşi denumire sistemică dar cu alt cod (EC 4.1.3.28), enzimă ce diferă de prima prin stereospecificitate care este opusă cu cea a enzimei cu codul EC 4.1.3.7. Aceste enzime catalizează reacția de sinteză a acidului citric prin condensarea acetil–CoA cu acidul oxalilacetic, adică prima etapă a ciclului acizilor tricarboxilici:



Acetil-CoA

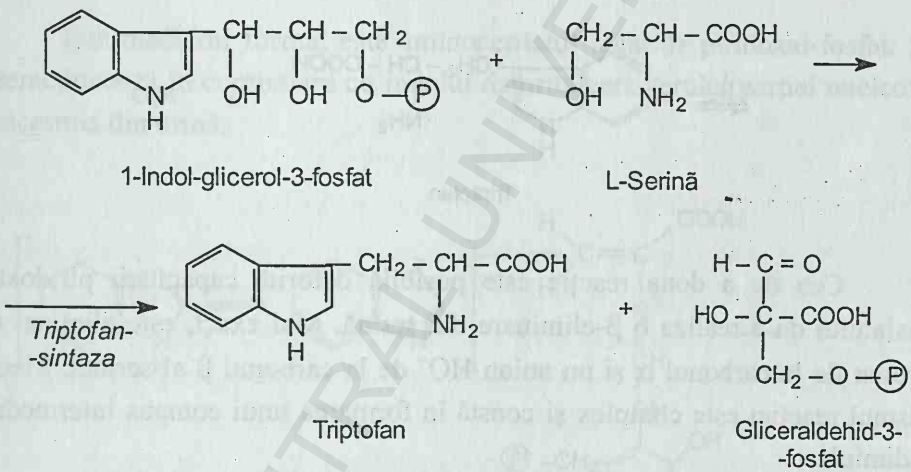
Oxaloacetat

BCU IAŞI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY



Citrat

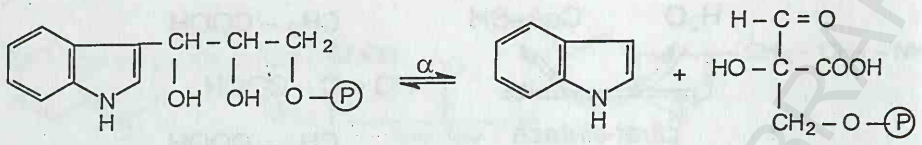
O altă liază implicată în procesele biosintetice este ***triptofan-sintaza*** numită şi ***triptofan-desmolază*** (***L-serină indolglicerolfosfat hidro–liaza***, E.C. – 4.2.1.20), enzimă ce catalizează reacţia de sinteză a triptofanului prin utilizarea în calitate de precursori a serinei şi indolglicerolfosfatului:



Triptofan-sintaza este de fapt un complex multienzimatic cu o structură cuaternară de tipul $\alpha_2\beta_2$. Molecula sa conţine două subunităţi proteice de tip α a câte 268 resturi de aminoacizi şi două componente β reprezentate de piridoxalfosfat.

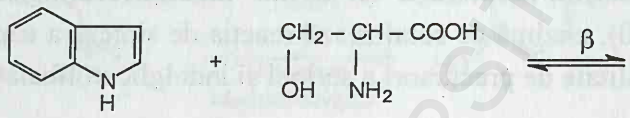
Cele două componente diferite conservă activitatea catalitică numai dacă sunt asamblate în structura cuaternară $\alpha_2\beta_2$ deşi catalizează reacţii diferite. Subunităţile α scindează indol-glicerol-fosfatul în indol şi aldehida 3-fosfoglicerică, aceasta din urmă intrând în metabolismul intermediar:

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

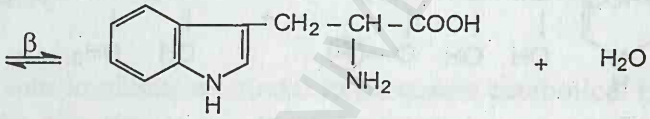


1-Indol-glicerol-3-fosfat Indol Gliceraldehid-3-fosfat

În etapa următoare, subunitățile β condensează indolul cu serina cu formare de triptofan şi eliminare de apă:

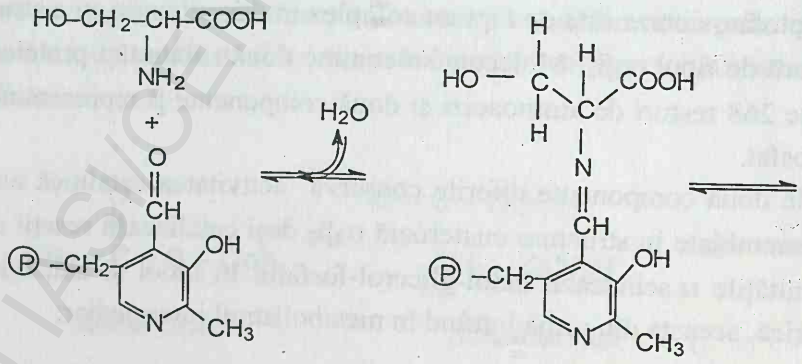


Indol L-Serină



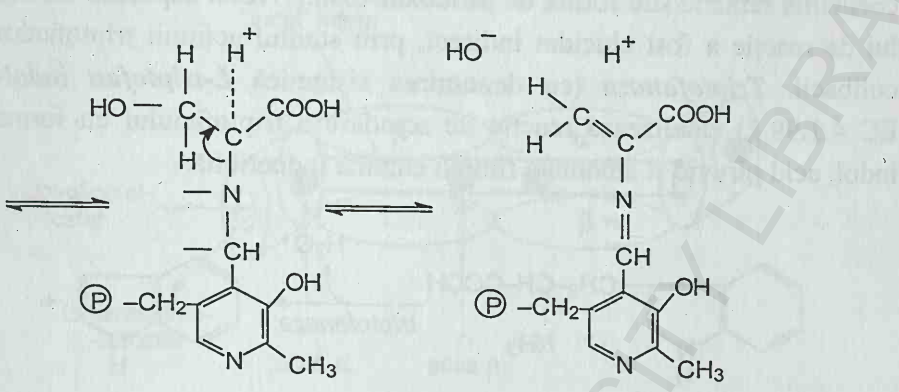
Triptofan

Cea de a doua reacție este posibilă datorită capacității piridoxalfosfatului de a realiza o β-eliminare din serină. Mai exact, este eliminat un proton de la carbonul α şi un anion HO^- de la carbonul β al serinei. Mecanismul reacției este complex şi constă în formarea unui compus intermediar aldiminic:

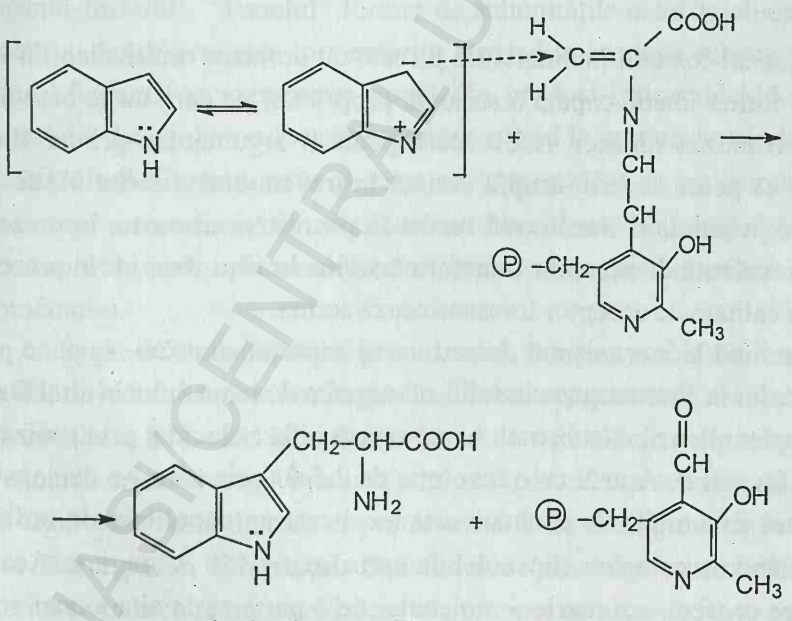


Legătură aldiminică serină – PALP

BCU IASI - CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

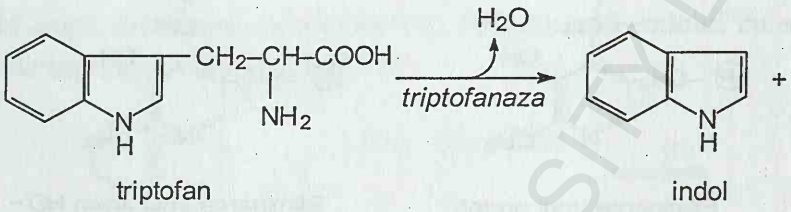


Intermediarul format este aminoacrilatul legat de piridoxal-fosfat. El interacționează în continuare cu indolul datorită caracterului parțial nucleofil al acestuia din urmă:



Spre deosebire de reacțiile de transaminare, unde piridoxal-fosfatul (legat de apoenzimă) trece în piridoxamin-fosfat, în cazul triptofan-sintazei

coenzima rămâne sub formă de piridoxal-fosfat. Acest aspect al mecanismului de reacție a fost elucidat indirect, prin studiul acțiunii triptofanazei din colibacil. ***Triptofanaza*** (cu denumirea sistemică ***L-triptofan indol-liaza***, EC 4.1.99.1) catalizează reacția de scindare a triptofanului cu formare de indol, acid piruvic şi amoniac, fiind o enzimă inductibilă:



triptofan indol

piruvat

Piridoxal-fosfatul (subunitățile β) este un cofactor multivalent în sensul că, sub formă liberă, capătă o serie de proprietăți pe care nu le posedă în complexul triptofan-sintazei. Acest lucru poate fi argumentat, printre altele, prin faptul că poate acționa asupra serinei în trei moduri diferite. Astfel, în absența acceptorului, el transformă serina în piruvat şi amoniac, în prezența indolului în calitate de acceptor transformă serina în triptofan, iar în prezența unui tiol în calitate de acceptor transaminează serina.

Revenind la mecanismul de acțiune al triptofan-sintazei, se pune problema modului în care reuşeşte indolul să migreze de la un situs la altul fără a părăsi complexul enzimă-substrat. Acest aspect a fost elucidat prin utilizarea metodei difracției de raze X cu o rezoluție de 2,5 Å prin care s-a demonstrat că cele patru subunități ale enzimei sunt localizate aproape liniar în ordinea αββα formând un complex elipsoidal de aproximativ 150 Å lungime. Această localizare conferă o simetrie a moleculei de o parte şi de alta a unei zone de contact dintre subunitățile β (fig. 17).

BCU CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

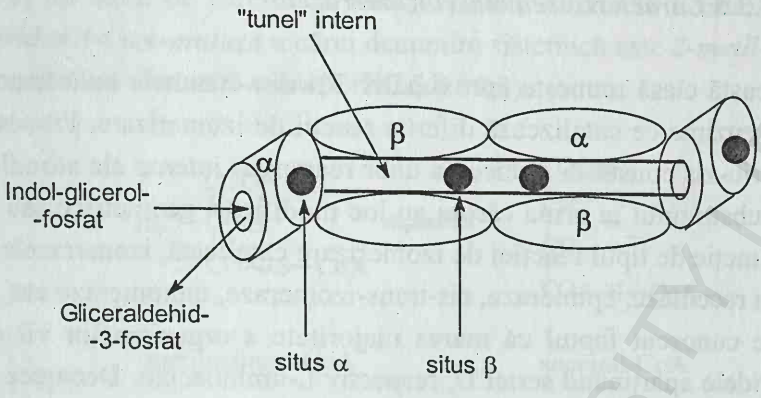


Fig. 17. Reprezentarea schematică a structurii cuaternare a complexului triptofan-sintazei (Hyde, C.C. et al. – 1988)

Subunitățile α sunt formate din câte opt fragmente helicoidale ce alternează cu câte opt fragmente pliate, toate acestea fiind convergente în jurul unei zone centrale unde este localizat centrul activ. Poziția exactă a acestui situs a fost identificată prin utilizarea unui inhibitor competitiv (indol-propanol-fosfatul). "Tunelul" format de subunitățile α se deschide spre două direcții: o deschidere este spre exterior servind la captarea substratului (indol-glicerol-fosfatul) şi expulzarea unuia din produşi (gliceraldehid-3-fosfatul), iar cealaltă deschidere este spre exterior servind la propulsarea indolului către subunitățile β. Centrul activ al acestora, răspunzător de realizarea celei de a doua etape a transformării, este localizat între două subunități β şi comunică cu exteriorul printr-o fantă al cărei diametru este suficient pentru expulzarea triptofanului.

Legat de transformarea propriu-zisă, s-a pus problema imposibilității expulzării indolului ca atare în mediu. Prin aceeaşi metodă s-a demonstrat că subunitățile α şi β sunt îndepărtate unele de celelalte la cel puțin 20 Å, ceea ce exclude orice structură comună cum ar fi, de exemplu, existența unor legături temporare flexibile care ar permite indolului să migreze de la un situs la altul fără a părăsi complexul. Deschiderea "tunelului" subunităților α spre interior se face către un tunel intern al proteinei prin care se face comunicarea între cele două situsuri şi care are dimensiuni ce permit migrarea a patru molecule de indol. Din această cauză, indolul migrează prin acest tunel, fiind izolat de exteriorul moleculei.

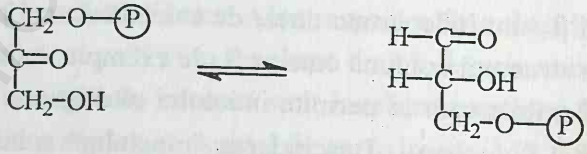
II.2.3.5 Caracterizarea clasei izomerazelor

Această clasă reuneşte aproximativ 3% din enzimele cunoscute până în prezent, enzime ce catalizează diferite reacţii de izomerizare. Procesul catalitic propriu-zis constă în inducerea unor rearanjări interne ale atomilor din molecula substratului în urma cărora au loc modificări geometrice sau structurale. În funcţie de tipul reacţiei de izomerizare catalizată, izomerazele pot fi împărţite în racemaze, epimeraze, cis-trans-izomeraze, tautomeraze etc.

Este cunoscut faptul că marea majoritate a organismelor vii conţin monozaharidele aparţinând seriei D, respectiv L-aminoacizii. Deoarece unele microorganisme conţin şi antipozii optici ai acestor compuşi, pentru acestea racemazele joacă un rol deosebit. Astfel, au fost descoperite şi studiate ***alanin-racemaza*** (EC 5.1.1.1), ***metionin-racemaza*** (EC 5.1.1.2), ***glutamat-racemaza*** (EC 5.1.1.3) etc.

Două izomeraze extrem de importante pentru participarea vitaminei A în procesul vederii sunt ***retinal-izomeraza*** cu denumirea sistemică ***all-trans-retinal-11-cis-trans-izomeraza*** (EC 5.2.1.3) şi respectiv ***retinol-izomeraza***, sau ***all-trans-retinol-11-cis-trans-izomeraza*** (EC 5.2.1.7) ce catalizează conversia formei trans a retinalului în izomerul 11-cis şi respectiv izomerul trans al retinolului în forma 11-cis.

O etapă importantă a secvenţei metabolice Embden-Meyerhof-Parnas o constituie izomerizarea reversibilă a celor două trioze fosforilate rezultate prin scindarea fructozo-1,6-difosfatului sub acţiunea aldolazei. Sub acţiunea ***triozo-fosfat-izomerazei*** are loc conversia permanentă a dihidroxiacetonfosfatului în aldehida 3-fosfoglicerică. Denumirea sistemică a enzimei este ***D-gliceraldehid-3-fosfat-cetol-izomeraza*** (EC 5.3.1.1).

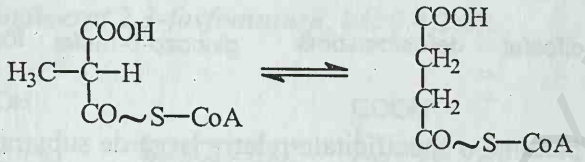


dihidroxiacetonfosfat

D-gliceraldehidfosfat

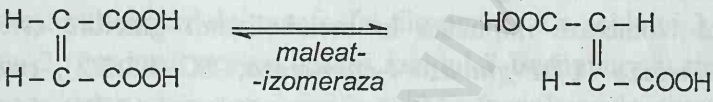
Din aceeaşi clasă a izomerazelor fac parte şi aşa-numitele transferaze intramoleculare care catalizează reacţiile de transfer ale unor grupe funcţiona-

le de la un atom de carbon la altul. Una din enzimele acestei grupe este ***metilmalonil-CoA-mutaza*** a cărei denumire sistemică este ***2-metil-3-carboxi-propanoil-CoA-carboxil-mutaza*** (EC 5.4.99.2):



metilmalonil-CoA succinil-CoA

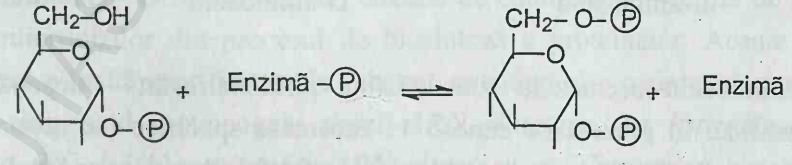
Una dintre enzimele ce catalizează conversia unui izomer geometric este ***maleat-izomeraza*** (***maleat cis-trans izomeraza***, EC 5.2.1.1). Ea catalizează transformarea acidului maleic (izomerul *cis* al maleatului) în acid fumaric (izomerul *trans*):



maleat fumarat

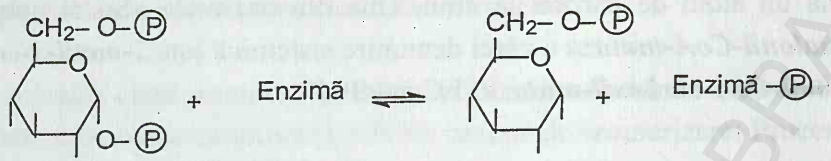
O izomerază foarte importantă implicată în glicoliza anaerobă este ***glucozofosfat-izomeraza***, numită şi ***fosfoglucomutază (α-D-glucozo-1,6-difosfomutaza***, EC 5.4.2.2), enzimă ce catalizează conversia glucozo-1-fosfatului în glucozo-6-fosfat. Reacţia este însă ceva mai complexă, ea realizându-se în două etape şi este posibilă datorită capacităţii enzimei de a exista sub două forme, una fosforilată (fosfoenzima) şi o altă formă defosforilată (defosfoenzima).

În prima etapă a transformării, glucozo-1-fosfatul este convertit în glucozo-1,6-difosfat sub acţiunea fosfoenzimei, iar în etapa a doua defosfoenzima clivează restul ortofosfat din poziţia 1 cu formare de glucozo-6-fosfat:



glucozo-1-fosfat fosfoenzimă glucozo-1,6-difosfat defosfoenzimă

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

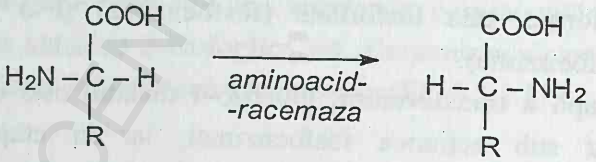


glucozo-1,6-difosfat defosfoenzimă glucozo-6-fosfat fosfoenzimă

Enzima prezintă o specificitate relativ largă de substrat, fiind capabilă să realizeze, deşi cu viteze mult mai mici, şi conversia altor α-D-hexoze monofosforilate, precum şi a α-D-ribozo-l-fosfatului. Iniţial s-a crezut că este vorba de o transferază, enzima fiind clasată în această grupă cu codul EC 2.7.5.1. Studiul mecanismului de reacţie a condus la concluzia că este vorba totuşi de o izomerază deoarece, în ansamblu, procesul constă în conversia glucozo-l-fosfatului în glucozo-6-fosfat.

O altă izomerază implicată în metabolismul glucidic este ***UDP-glucozo-4-izomeraza*** (***UDP-glucozo-4-epimeraza***, EC 5.1.3.2), enzimă ce catalizează conversia glucozei (sub forma sa activă de UDP-glucoză) în epimerul său în raport cu C_4 – UDP-galactoza. Această reacţie joacă un rol esenţial în metabolismul intermediar, făcând parte din căile de intertransformare ale monozaharidelor.

Multe izomeraze participă la metabolismul aminoacizilor, catalizând conversia L-aminoacizilor în antipozii optici corespunzători:

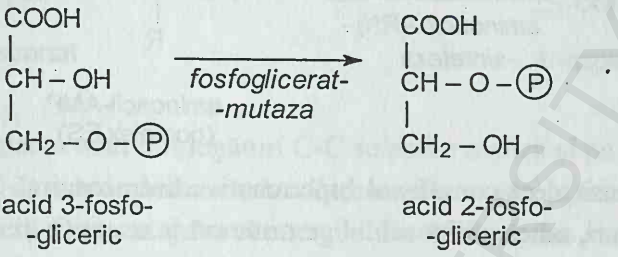


L-aminoacid D-aminoacid

Aminoacid-racemazele sunt enzime piridoxalfosfat – dependente, înalt specifice. În prezent se cunosc 11 racemaze specifice (ce acţionează asupra izomerilor L ai alaninei, metioninei, acidului glutamic, prolinei, lizinei, treoninei, hidroxiprolinei, argininei, fenilalaninei, ornitinei şi acidului

aspartic) şi o racemază cu specificitate mai largă (***aminoacid-racemaza***, EC 5.1.1.10) ce poate acționa asupra mai multor aminoacizi.

Una din ultimele etape ale glicolizei anaerobe o constituie conversia acidului 3-fosfogliceric în acid 2-fosfogliceric sub acțiunea ***fosfoglicerat-kinazei*** (***D-fosfoglicerat 2,3-fosfomutaza***, EC 5.4.2.1):



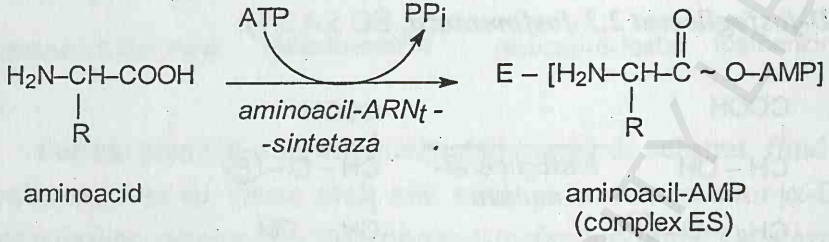
Fosfoglicerat-kinaza (fosfoglicerat-mutaza) este o enzimă ce catalizează transferul radicalului ortofosfat din poziția 3 a acidului 3-fosfogliceric în poziția 2. Produsul acestei reacții (acidul 2-fosfogliceric) trece apoi prin deshidratare sub acțiunea enolazei în acid fosfoenolpiruvic, precursor imediat al piruvatului.

II.2.3.6 Caracterizarea clasei ligazelor (sintetazelor)

Această clasă cuprinde aproximativ 5% din enzimele cunoscute până în prezent, liazele catalizând reacții de formare a unor noi legături carbon-carbon sau carbon-heteroatom. De regulă, aceste reacții au loc cu consum de energie, ele fiind cuplate cu reacții de hidroliză ale ATP-ului sau ale altor nucleozidtrifosfați. Denumirea sistemică se face prin adăugarea termenului ***ligaza*** la numele substratului, sau a termenului ***sintetaza*** la numele produsului de reacție.

O grupă importantă de enzime ce fac parte din această clasă o constituie ***aminoacil-ARN$_t$-sintetazele***, enzime ce catalizează reacțiile de activare ale aminoacizilor din procesul de biosinteză a proteinelor. Aceste enzime prezintă o înaltă specificitate de substrat, existând câte o sintetază pentru fiecare aminoacid proteinogen: ***tirozil-ARN$_t$-sintetaza*** sau ***L-tirozin-ARN$_t^{tyr}$-ligaza*** (EC 6.1.11), ***triptofan-ARN$_t$-sintetaza*** cu denumirea sistemică ***L-triptofanil-ARN$_t^{trp}$-ligaza*** (EC 6.1.1.2), ***treonin-ARN$_t$-sintetaza*** sau ***L-treonil-ARN$_t^{thr}$- ligaza*** (EC 6.1.1.3) ş.a.m.d.

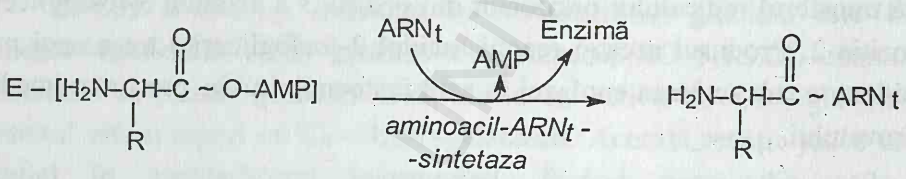
Formarea complexului aminoacil-ARN$_t$ este un proces complex ce se realizează în două etape catalizate de aceeaşi enzimă. Procesul debutează prin activarea aminoacidului cu ajutorul energiei din ATP:



aminoacid

aminoacil-AMP
(complex ES)

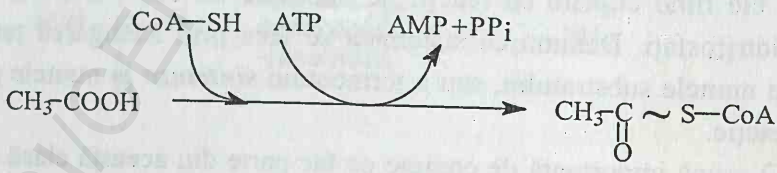
Se formează deci complexul hiperreactiv dintre enzimă şi două din cele trei substraturi, adică aminoacidul ce urmează a se activa şi molecula de ATP. Acest complex interacţionează în etapa următoare cu cel de-al treilea substrat care este ARN$_t$ – ul specific aminoacidului activat:



aminoacil-AMP
(complex ES)

aminoacil-ARNt

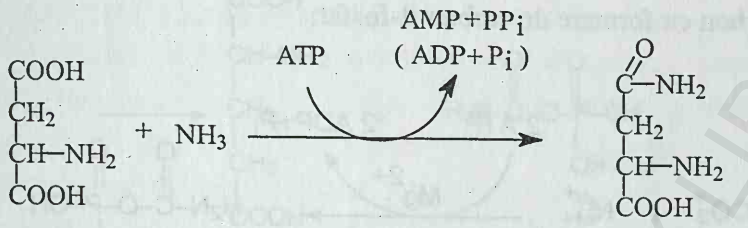
Din subclasa 6.2. (ligaze ce catalizează formarea de legături C-S) face parte şi ***acetil-CoA-sintetaza*** sau ***acetat-CoA-ligaza*** (EC 6.2.1.13) ce catalizează reacţia de biosinteză a acetatului activ:



acetat

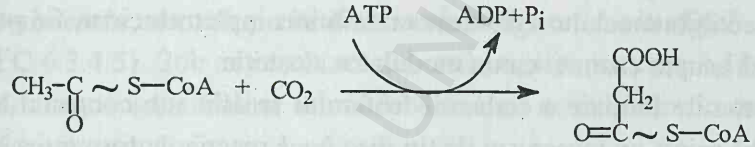
acetil-CoA

Subclasa 6.3. cuprinde sintetazele ce catalizează formarea unei legături C-N. Conversia acidului aspartic în amida sa se poate realiza prin aminare directă, sub acţiunea a două enzime: ***L-aspartat:amoniac-ligaza (AMP formatoare)***(EC 6.3.1.1) şi respectiv ***L-aspartat:amoniac-ligaza (ADP formatoare)*** (EC 6.3.1.4):



L-aspartat L-asparaginã

Formarea unei noi legături C-C se poate realiza şi pe seama CO_2 (respectiv HCO_3^-) sub acţiunea ***carboxilazelor***. De exemplu, biosinteza malonil-CoA din acetil-CoA cu ajutorul energiei din ATP are loc sub acţiunea ***acetil-CoA-carboxilazei*** a cărei denumire sistemică este ***acetil-CoA:dioxid de carbon-ligaza*** (EC 6.4.1.2):



acetil-CoA malonil-CoA

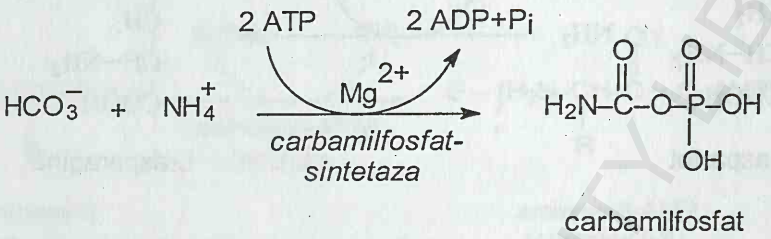
Acetil-CoA-carboxilaza este o enzimă biotin-dependentă, cofactorul legându-se de apoenzimă printr-o legătură de tip amidic ce se formează între gruparea –COOH a biotinei şi o grupare ε-amino a unui rest de lizină din structura apoenzimei. Procesul are loc în două etape: în prima fază se realizează carboxilarea biotinei, iar în etapa următoare dioxidul de carbon este transferat pe restul acetil.

Este cunoscut faptul că amoniacul rezultat în urma proceselor de dezaminare a aminoacizilor sau din alte căi catabolice ale substanţelor azotate este toxic pentru celula vie. În organismele mamiferelor devine inofensiv prin transformarea sa în uree pe o cale metabolică specială numită ***ciclul ureogenetic*** sau ***ciclul Krebs-Henseleit*** în care sunt implicate şi două ligaze importante: carbamilfosfat-sintetaza şi arginino-succinat-sintetaza.

Această cale metabolică debutează prin mobilizarea amoniacului sub acţiunea ***carbamilfosfat-sintetazei*** (***CO_2:amoniac-ligaza carbamat fosforilantă***, EC 6.3.4.16) care, în prezenţă de ATP ca sursă de energie şi

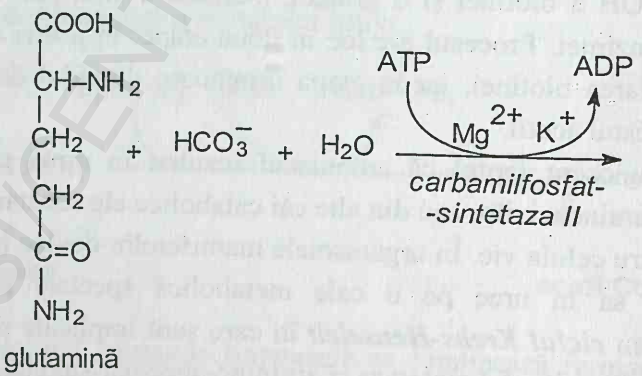
B.C.U. „M. EMINESCU" IAŞI
BIOLOGIE

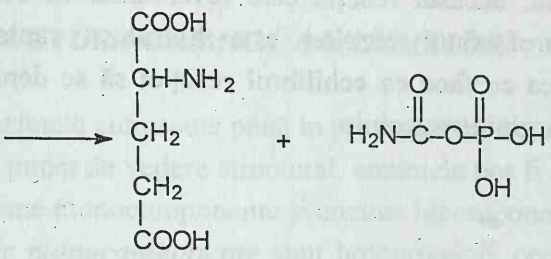
radicali ortofosfat, catalizează reacția de condensare a amoniacului cu dioxidul de carbon cu formare de carbamil-fosfat:



În hepatocite au fost descoperite două enzime ce catalizează acest proces şi anume ***carbamilfosfat-sintetaza I,*** localizată în mitocondriile celulelor hepatice şi ***carbamilfosfat-sintetaza II,*** prezentă în citoplasmă. Reacția de formare a carbamil-fosfatului este accelerată de N-acetil-glutamat sau de alți derivați acil-glutamici identificați în țesutul hepatic. Mecanismul implicării N-acetilglutamatului este deocamdată incomplet elucidat. Se pare că el acționează asupra enzimei ca un modulator alosteric.

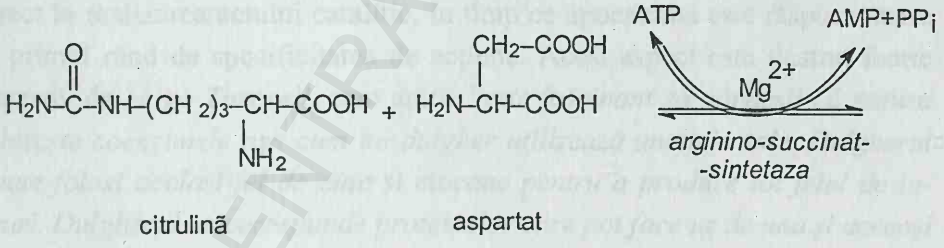
Viteza de formare a carbamil-fosfatului se află sub controlul argininei care inhibă printr-un mecanism de tip *feed back* reacția de formare a N-acetil-glutamatului care, la rândul său, stimulează biosinteza carbamil-fosfatului. Carbamil-fosfat-sintetaza II, prezentă în citosol, a fost identificată şi la bacterii unde catalizează reacția de biosinteză a carbamil-fosfatului prin utilizarea glutaminei în calitate de donor de grupări aminice:



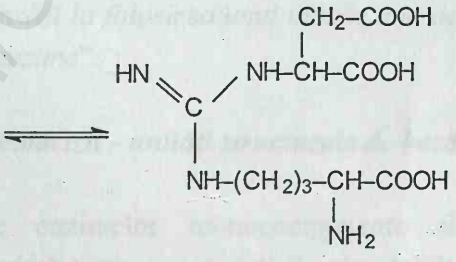


glutamat carbamilfosfat

La bacterii, formarea carbamil-fosfatului are loc în absența N-acetil-glutamatului, iar consumul de energie este mult mai mic, fiind necesară o singură moleculă de ATP. Indiferent de calea prin care s-a format, carbamil-fosfatul participă în etapa următoare la o reacție de condensare cu ornitina rezultând citrulina, sub acțiunea ornitin-transcarbamilazei. Transformarea în continuare a citrulinei are loc sub acțiunea altei ligaze importante – ***arginino-succinat-sintetaza***, numită şi ***citrulin-succinat-ligaza*** (***L-citrulin:L-aspartat-ligaza***, EC 6.3.4.5). Sub acțiunea acestei enzime şi în prezența ATP-ului şi a ionilor de magneziu, citrulina se condensează cu acidul aspartic cu formare de acid arginino-succinic:



citrulină aspartat



acid arginino-succinic

BCU IAȘI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

În principiu, această reacție este reversibilă. În condiții fiziologic normale însă, pirofosfatul rezultat este hidrolizat rapid sub acțiunea ***pirofosfatazei***, ceea ce face ca echilibrul reacției să se deplaseze în sensul formării acidului arginino-succinic.

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

II.3 STRUCTURA CHIMICĂ A ENZIMELOR

Toate enzimele cunoscute până în prezent, fără excepție, sunt de natură proteică. Din punct de vedere structural, enzimele pot fi clasificate în două mari grupe: enzime monocomponente și enzime bicomponente.

Enzimele monocomponente sunt holoproteine, ceea ce înseamnă că moleculele acestora sunt formate din una sau mai multe catene polipeptidice.

Enzimele bicomponente sunt heteroproteine (proteine complexe sau proteine conjugate) și conțin, în afară de componenta polipeptidică și o componentă de altă natura, neproteică, numită ***cofactor enzimatic***. Componenta proteică a enzimelor bicomponente poartă numele de ***apoenzimă***.

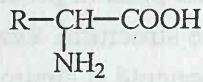
Legarea cofactorului de apoenzimă se face în mod diferit. Atunci când între cele două componente iau naștere legături relativ slabe, necovalente, cofactorul poartă numele de ***coenzimă***, iar dacă legarea se face puternic, prin legături covalente, componenta neproteică se numește ***grupare prostetică***. Nu se poate face o delimitare netă între cele două noțiuni, deoarece se întâmplă uneori ca același cofactor enzimatic să fie coenzimă pentru unele enzime și grupare prostetică pentru altele.

Pentru enzimele bicomponente, cofactorul enzimatic este implicat direct în realizarea actului catalitic, în timp ce apoenzima este răspunzătoare în primul rând de specificitatea de acțiune. Acest aspect este ilustrat foarte sugestiv de *Hugo Theorell*, care arată: "*este fascinant să gândești că natura folosește coenzimele așa cum un dulgher utilizează uneltele sale. Dulgherul poate folosi același fel de cuie și ciocane pentru a produce tot felul de lucruri. Dulgherul ar corespunde proteinelor care pot face uz de una și aceeași coenzimă pentru o largă varietate de scopuri. De ceea, natura a fost în stare să se limiteze ea însăși la folosirea unui număr mic de compuși chimici pentru funcțiile de coenzime*".

II.3.1 Aminoacizii - unități structurale de bază ale enzimelor

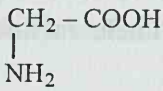
Moleculele enzimelor monocomponente și apoenzimele celor bicomponente prezintă toate caracteristicile structurale ale proteinelor în general. Ca toate proteinele, enzimele conțin cei 20 (22) aminoacizi proteinogeni și doar în cazuri extrem de rare se pot întâlni și alți aminoacizi.

Aminoacizii proteinogeni, deci şi cei ce intră în structura enzimelor, sunt α-aminoacizi, cu excepţia prolinei şi hidroxiprolinei care sunt α-iminoacizi :

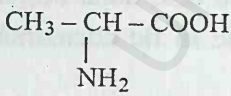


Cu excepţia glicinei, toţi aminoacizii proteinogeni conţin unul sau chiar doi atomi de carbon chirali, prezentând deci izomerie optică. Ca şi în cazul monozaharidelor, apartenenţa aminoacizilor la seria D sau L se face prin compararea configuraţiei atomului de carbon α care este asimetric, cu atomul de carbon chiral al aldehidei L-glicerice, respectiv D-glicerice. Aminoacizii naturali aparţin seriei L deoarece organismele vii nu dispun de echipamentele enzimatice specifice D-aminoacizilor. În funcţie de structura lor chimică, aminoacizii proteinogeni pot fi clasificaţi în următoarele grupe:

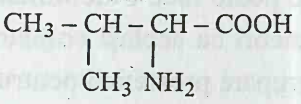
1. Aminoacizii monoamino-monocarboxilici:



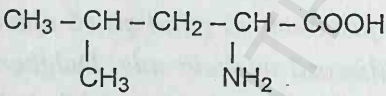
glicocol



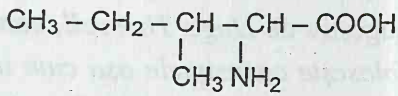
α-alaninã



valinã

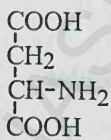


leucinã

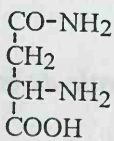


izoleucinã

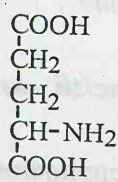
2. Aminoacizii monoamino-dicarboxilici:



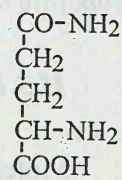
acid aspartic



asparaginã



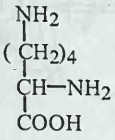
acid glutamic



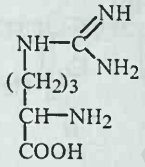
glutaminã

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

3.Aminoacizii diamino-monocarboxilici:

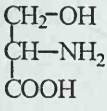


lizinã

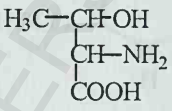


argininã

4. **Hidroxiaminoacizi:**

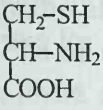


serinã

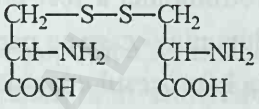


treoninã

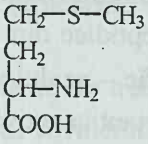
5. **Tioaminoacizi:**



cisteinã

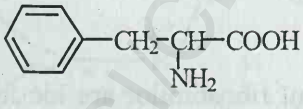


cistinã

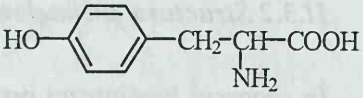


metioninã

6. **Aminoacizi aromatici:**



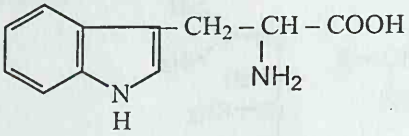
fenilalaninã



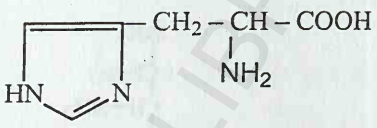
tirozinã

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

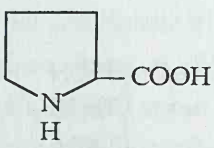
7. Aminoacizi heterociclici:



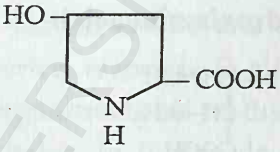
triptofan



histidinã

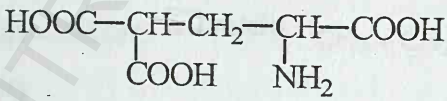


prolinã



hidroxiprolinã

În foarte puține cazuri, în afară de cei 20 (22) aminoacizi proteinogeni, pot fi întâlnite în structura catenelor polipeptidice resturi ale aşa-numiților aminoacizi rari. De exemplu, la capătul N-terminal al catenei polipeptidice din structura protrombinei a fost pus în evidență un aminoacid specific – acidul γ-carboxi-glutamic – care se pare că joacă un rol extrem de important în activarea acesteia în procesul coagulării sanguine:

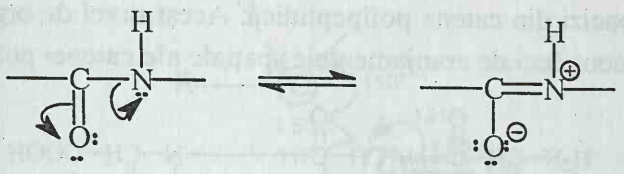


acid γ-carboxiglutamic

II.3.2 Structura enzimelor

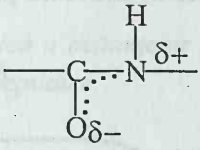
În procesul biosintezei proteice la nivelul ribosomilor are loc formarea de legături peptidice între resturile de aminoacizi a căror succesiune în catena polipeptidică este determinată genetic. Acestea sunt legături amidice secundare, cu caracter parțial de dublă legătură:

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY



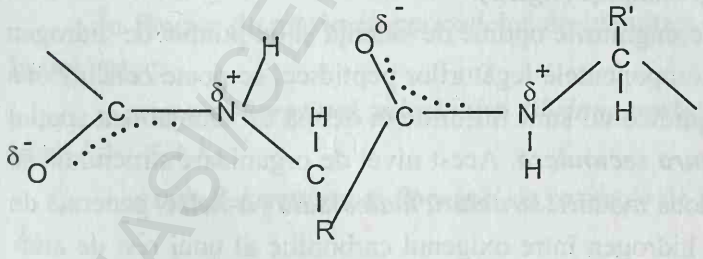
I II

Datorită fenomenului de conjugare, atomii implicați în legătura peptidică sunt coplanari, în forma trans:



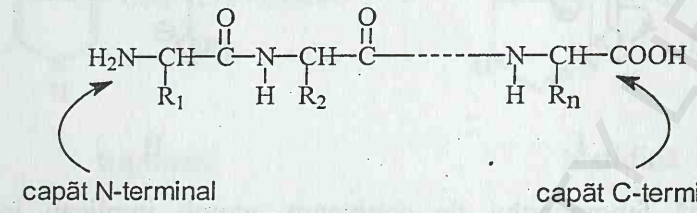
Aceasta înseamnă că legătura peptidică C – N nu este simplă ci parțial dublă, fiind astfel împiedicată rotația liberă a substituenților. Acest caracter de legătură parțial dublă are o importanță deosebită pentru structurile de ordin superior ale proteinelor.

La nivelul legăturilor peptidice se întâlnește izomeria de tip trans, iar rotația liberă este permisă numai la nivelul celorlalte legături covalente. Orientarea spațială a catenelor polipeptidice este datorată, în principal, acestor rotații libere în jurul legăturilor menționate:

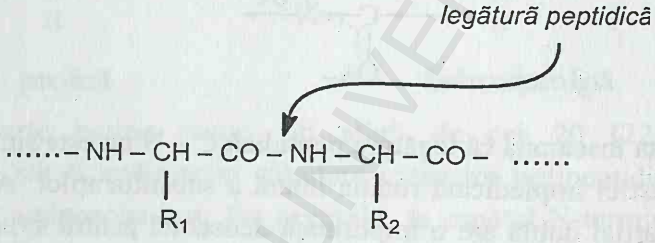


Fiind proteine, enzimele prezintă aceeași organizare structurală specifică tuturor proteinelor caracterizată prin structură primară, secundară, terțiară și cuaternară.

Structura primară este dată de numărul, natura şi succesiunea resturilor de aminoacizi din catena polipeptidică. Acest nivel de organizare structurală nu ţine cont deci de aranjamentele spaţiale ale catenei polipeptidice:



În structura primară, resturile de aminoacizi sunt unite prin legături peptidice identice cu cele întâlnite în structura peptidelor:



Studiul peptidelor sintetice cu ajutorul metodei difracţiei de raze X prin cristale pure a permis determinarea distanţelor interatomice într-o catenă polipeptidică, precum şi a unghiurilor dintre atomii componenţi. Aceste determinări au demonstrat existenţa unei perioade de identitate de 7,2 Å pentru fiecare două resturi de aminoacizi. Totodată s-a observat că distanţa interatomică C – N este mai mică, iar distanţa C = O este mai mare decât cele normal întâlnite în alţi compuşi (fig.18).

Ţinând cont de unghiurile optime de valenţă şi de punţile de hidrogen ce se stabilesc între componentele legăturilor peptidice, se poate concluziona că moleculele polipeptidice nu sunt filiforme ci ocupă un aranjament spaţial care determină ***structura secundară***. Acest nivel de organizare structurală se poate materializa în două moduri: ***structura helicoidală*** (***α-helix***) generată de formarea punţilor de hidrogen între oxigenul carbonilic al unui rest de aminoacid şi hidrogenul iminic al altui rest de aminoacid din aceeaşi catenă polipeptidică şi respectiv ***structura β-pliată*** când legăturile de hidrogen se formează între aceeaşi atomi, dar sunt intercatenare.

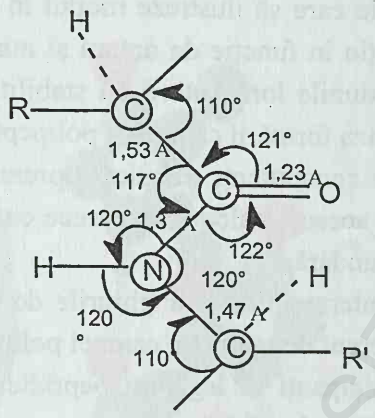


Fig 18. Reprezentarea schematică a distanțelor interatomice și unghiurilor de valență în catenele polipeptidice

În acest din urmă caz, straturile β-pliate pot avea structură ***paralelă*** (când o extremitate a moleculei conține capetele N-terminale, iar cealaltă capetele C-terminale ale catenelor polipeptidice), sau ***antiparalelă*** (fiecare extremitate conține atât capete N-terminale cât și C-terminale).

Structura α-helicoidală. Studiul proteinelor fibrilare din clasa scleroproteinelor prin metoda difracției razelor X a evidențiat faptul că acestea se caracterizează prin prezența unor regularități structurale ale moleculei, prin unități care se repetă și care sunt dispuse de-a lungul unui ax imaginar al moleculei.

Aceste regularități în structura moleculei au fost numite ***perioade de identitate*** și ele diferă de la o proteină la alta.

În funcție de mărimea perioadelor de identitate, proteinele se împart în trei grupe:

– ***grupa α–keratinei, miozinei*** și ***fibrinogenului*** cu perioada de identitate 5,1 – 5,4 Å;

– ***grupa β–keratinei*** și ***fibroinei*** cu perioada de identitate de 6,5 – 7,0 Å;

– ***grupa colagenului*** cuprinde proteine a căror perioadă de identitate este cuprinsă între 2,8 – 2,9 Å.

Efectuând experimente pe cristale peptidice, *Pauling* și *Corey* au stabilit cu rigurozitate condițiile formării catenelor polipeptidice și au constituit

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

modele experimentale care să ilustreze modul în care catenele polipeptidice sunt orientate în spațiu în funcție de natura și numărul legăturilor peptidice, precum și de dimensiunile lor. Autorii au stabilit de asemenea, următoarele criterii care stau la baza formării catenelor polipeptidice:

– aminoacizii constituenți trebuie să prezinte configurație L și au în structura proteinelor aceeași valoare, deoarece catenele lor laterale nu influențează structura secundară;

– distanțele interatomice și unghiurile de valență trebuie să prezinte aceleași valori, indiferent de mărimea catenei polipeptidice;

– atomii participanți la legătura peptidică trebuie să fie coplanari, această așezare fiind favorizată energetic;

– modelul experimental elaborat pe baza datelor de laborator trebuie să permită formarea unui număr maxim posibil de legături de hidrogen.

Pe baza acestor postulate, *Pauling* și *Corey* găsesc că cel mai simplu aranjament corespunzător acestor cerințe este ***modelul helicoidal*** sau ***spiralat***, denumit ***α-helix***. Acesta rezultă prin spiralizarea catenei polipeptidice în jurul unui cilindru imaginar (fig. 19).

În funcție de direcția de spiralizare, α-helixul poate să apară teoretic sub două forme:

– **α-helixul de dreapta** are sensul unui șurub cu pasul spre dreapta;

– **α-helixul de stânga** are sensul unui șurub cu pasul spre stânga.

Catenele laterale ale resturilor de aminoacizi ies în afara corpului propriu-zis al α-helixului și pot interacționa între ele sau cu solventul în care este dizolvată proteina.

Dintre toți aminoacizii proteinogeni, prolina, hidroxiprolina și chiar glicocolul nu se încadrează perfect în α-helix, determinând o deranjare a structurii regulate a acestuia. Această structură helicoidală a macromoleculelor proteice a fost postulată cu 16 ani înaintea lui *Pauling* și *Corey* de către biochimistul român *Haralamb Vasiliu*.

BCU IASI - CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

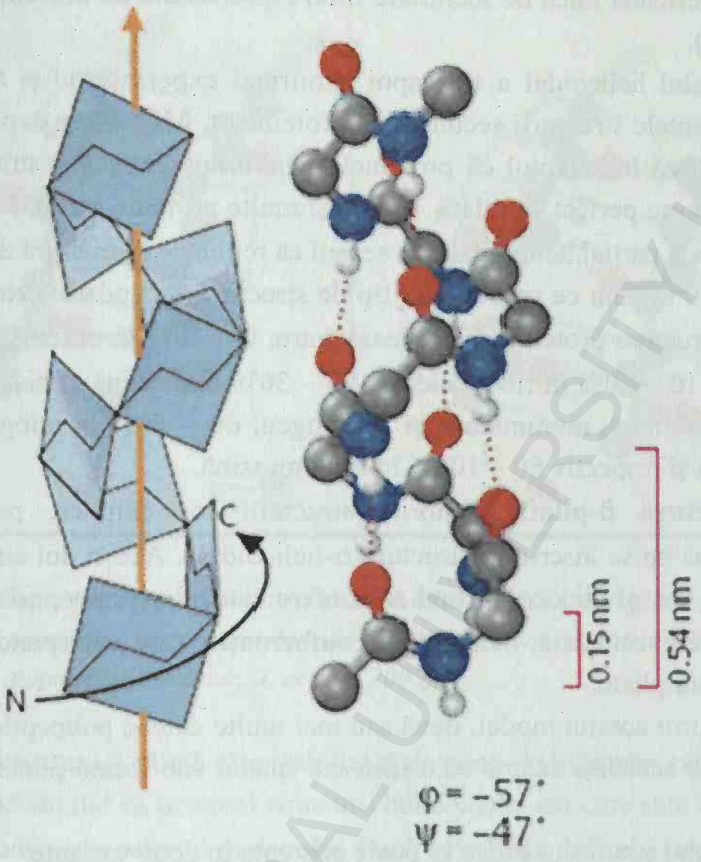


Fig. 19. Reprezentarea schematică a modelului α-helicoidal al structurii secundare a proteinelor (Koolman, J. et al. – 2005).

Aşezarea spaţială, care conferă moleculei o arhitectură structurală specială, este menţinută datorită formării unui mare număr de punţi de hidrogen intracatenare la care participă oxigenul carbonilic din vecinătatea unei legături peptidice şi hidrogenul iminic din vecinătatea alteia, situată la o distanţă de 4 resturi de aminoacizi. Aceste punţi de hidrogen sunt aproape paralele cu axul moleculei deoarece într-o spiră intră 3,6 resturi de aminoacizi.

Distanţa dintre două spire succesive este de 5,41 Å, iar diametrul lor este de 0,101 Å. După un interval al α-helixului care cuprinde 18 resturi de aminoacizi, adică 27 Å, α-helixul este superpozabil, adică se repetă identic după fiecare 5 spire. Acest interval reprezintă aşa-numita ***perioadă mare de***

BCU CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

identitate (perioada mică de identitate fiind reprezentată de secvența – NH – *CH – CO –).

Modelul helicoidal a fost apoi confirmat experimental și reprezintă una din variantele structurii secundare a proteinelor. Multe date experimentale demonstrează însă faptul că proteinele native nu prezintă o structură secundară total sau perfect spiralată. Cele mai multe proteine prezintă o organizare structurală parțial helicoidală, în sensul că regiuni cu structură de α-helix pot alterna cu regiuni ce prezintă alt tip de structură secundară. Procentul de α-helix în structura proteinelor oscilează între: 0 – 10% în cazeină, actină și γ-globulină, 10 – 20% în ribonuclează, 20 – 30% la pepsină și histone, 30 – 45% la ovalbumină, muramidază și fibrinogen, 60 – 80% la mioglobină și hemoglobină și respectiv 80 – 100% în tropomiozină.

Structura β-pliată. Datorită structurii lor chimice, prolina și hidroxiprolina nu se înscriu în structura α-helicoidală. Aceşti doi aminoacizi heterociclici, dar și glicocolul, tind să confere catenelor polipeptidice un alt tip de structură secundară, denumită **β-conformație**, care corespunde modelului straturilor pliate.

Conform acestui model, două sau mai multe catene polipeptidice, sau fragmente ale aceleiași catene se orientează spațial sub formă pliată, în zig-zag (fig. 20).

Modelul straturilor pliate se poate prezenta în două variante:

– **modelul straturilor pliate paralele** (caracteristic de exemplu pentru β-keratină) se întâlnește atunci când la o extremitate a moleculei sunt orientate capetele C-terminale, iar la cealaltă, capetele N-terminale ale catenelor polipeptidice;

– **modelul straturilor pliate antiparalele** (întâlnit de exemplu la fibroină) se caracterizează prin faptul că la ambele extremități ale moleculei capetele C-terminale ale catenelor polipeptidice alternează cu cele N-terminale. În mod automat, atunci când structura β-pliată este formată de diferite fragmente ale aceleiași catene polipeptidice, aceasta va fi de tip antiparalel.

BCU IAȘI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

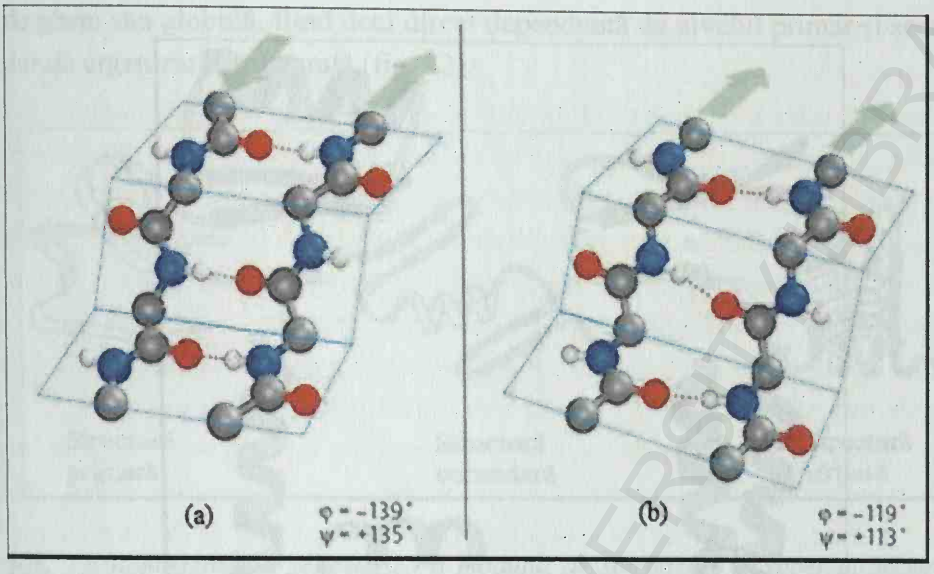


Fig. 20. Reprezentarea schematică a modelului straturilor β-pliate ale structurii secundare a proteinelor (a – structura antiparalelă; b – structura papalelă) (Koolman, J. et al. – 2005).

Structura β-pliată este stabilizată de punți de hidrogen care se formează în mod similar ca în cazul structurii helicoidale, dar care sunt intercatenare şi perpendiculare pe axul moleculei. Dacă la α-helix radicalii laterali ai resturilor de aminoacizi sunt orientați spre exterior, în structura β-pliată ei se orientează de o parte şi de alta a planului legăturii peptidice, perpendicular pe acesta.

Există foarte puține proteine (enzime) a căror structură să fie exclusiv α-helicoidală sau exclusiv β-pliată. Marea majoritate a proteinelor prezintă structuri secundare în care unul sau mai multe fragmente α-helicoidale alternează cu unul sau mai multe fragmente β-pliate. De regulă, punctele de trecere de la fragmentele helicoidale la cele pliate şi invers sunt reprezentate de resturile de prolină şi hidroxiprolină şi uneori de cele de glicină, aminoacizi care, din cauza structurii lor chimice, nu se înscriu în nici una din aceste două forme structurale.

În funcție de numărul de fragmente helicoidale şi pliate, structurile secundare ale proteinelor (enzimelor) pot fi de mai multe tipuri: αα, ββ, αβα, βαβ etc. (fig. 21).

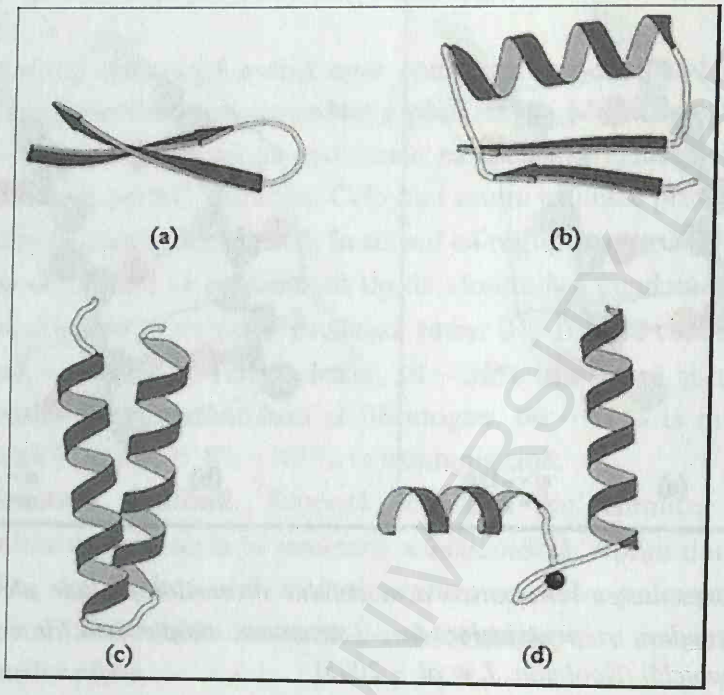


Fig. 21 .Reprezentarea grafică a structurii secundare a proteinelor: a – structură de tip ββ, b – structură de tip βαβ, c – structură de tip αα, d – structură de tip αβα (Branden, C. et al. – 1999)

Structura terțiară a macromoleculelor de protein-enzime este dată de superspiralizarea catenei (catenelor) polipeptidice într-o structură spațială complexă sub formă de ghem (globulă). Superspiralizarea este generată de formarea punților disulfidice între resturi de cisteină aflate în locuri total diferite ale catenei polipeptidice. Majoritatea proteinelor native au o structură spațială compactă determinată de dimensiunile și polaritatea resturilor de aminoacizi precum și de succesiunea acestora în catenele polipeptidice componente.

Acest nivel de organizare structurală reprezintă deci rezultatul interacțiunilor dintre resturile aminoacizilor din catenele polipeptidice. Structura terțiară este definită ca fiind forma structurală ce rezultă prin superspiralizarea a două sau mai multe catene polipeptidice ce conțin fragmente α-helicoidale și β-pliate într-o arhitectură spațială complexă sub formă

de ghem sau globulă, fiind deci direct dependentă de nivelul primar şi secundar de organizare structurală (fig. 22).

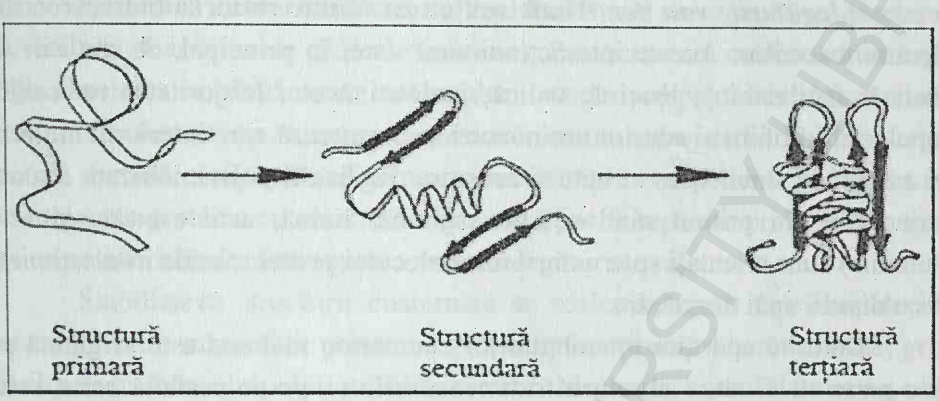


Fig. 22. Reprezentarea schematică a modului de spiralizare şi superspiralizare a unei catene polipeptidice cu formarea structurii secundare şi terţiare (Rayment, I. – 2003)

Formarea unei structuri globulare native, caracteristică pentru o proteină dată este un proces complex ce are la bază formarea unei multitudini de legături slabe, necovalente. Principalele proteine ale căror structuri terţiare au fost bine studiate sunt hemoglobina, mioglobina, muramidaza, ribonucleaza, papaina, chimotripsinogenul, carboxipeptidaza A, subtilizina şi altele.

Menţinerea şi stabilizarea structurii terţiare se realizează prin forţele de atracţie ce apar între radicalii aminoacizilor componenţi care se pot orienta în aşa fel încât să ajungă în poziţii favorabile formării diferitelor tipuri de legături. Dintre acestea, cele mai importante sunt următoarele:

– ***legăturile de hidrogen*** se formează între grupările fenolice ale resturilor de tirozină şi respectiv grupele –COOH aparţinând resturilor de acid aspartic şi glutamic, sau între nucleul imidazolic al histidinei şi grupa –OH a serinei;

– ***legăturile ionice*** se formează între grupele –COOH ale acizilor aspartic şi glutamic şi grupele $-NH_2$ ale lizinei şi argininei. Numărul legăturilor ionice este relativ mic, deoarece majoritatea grupelor funcţionale ionizate interacţionează cu dipolii apei. Conformaţia proteinelor în soluţie este de aşa natură încât un număr cât mai mare de grupări polare să fie expuse la suprafa-

ța arhitecturii moleculare, cu grupările hidrofobe orientate, de regulă, spre interiorul moleculei;

– ***legăturile van der Waals*** se formează între resturile hidrocarbonate ale aminoacizilor. Aceste interacțiuni sunt date, în principal, de resturile de alanină, fenilalanină, leucină, valină, izoleucină etc. Majoritatea radicalilor nepolari, hidrofobi ai acestor aminoacizi se orientează spre interiorul moleculei asigurând stabilitatea structurii acestora. Radicalii polari, ionizați, ai unor aminoacizi (în primul rând cei de arginină, lizină, acid aspartic şi acid glutamic) sunt orientați spre exteriorul moleculei proteice unde interacționează cu dipolii apei din mediu.

Datorită apariției interacțiunilor enumerate mai sus este asigurată pe de o parte stabilitatea structurii tridimensionale şi, pe de cealaltă parte, conformația optimă din punct de vedere termodinamic.

Pe de altă parte, diversitatea tipurilor de legături întâlnite în structura terțiară a proteinelor, precum şi valorile energiilor de legătură, explică marea labilitate a proteinelor sub acțiunea diverşilor factori fizico-chimici cum ar fi pH-ul mediului, temperatura, presiunea osmotică, prezența sau absența unor substanțe chimice etc.

Observație! Dezorganizarea structurii terțiare, care este foarte complexă şi variată, determină pierderea proprietăților biologice ale proteinelor!

Deseori se pot produce modificări foarte mici în conformația determinată de structura terțiară prin legarea într-un mod oarecare (de exemplu adsorbție) a unui compus chimic cu masă moleculară mică. Aceste modificări conformaționale poartă numele de ***efect alosteric*** şi joacă un rol extrem de important în reglarea activității enzimelor.

În ceea ce priveşte forma moleculelor proteice care este dată de structura secundară şi terțiară a acestora, se cunosc două tipuri extreme (proteine fibrilare şi respectiv proteine globulare), majoritatea proteinelor având însă structuri intermediare. Forma moleculelor proteice nu depinde numai de factorii ce țin de însăşi structura proteinelor ci şi de factorii de mediu.

Replierea şi superspiralizarea catenelor polipeptidice depind de pH-ul mediului, de salinitatea acestuia, de prezența sau absența anumitor compuşi chimici, de presiunea osmotică, de temperatură etc., ceea ce explică marea variabilitate funcțională a proteinelor în raport cu mediul de reacție, precum

şi faptul că unele proteine fibrilare pot trece în formă globulară şi invers, odată cu modificarea caracteristicilor mediului.

Structura cuaternară este cel mai înalt nivel de organizare structurală, întâlnită doar la unele proteine (enzime). Prin structura cuaternară se înţelege asocierea a două sau mai multe catene polipeptidice (monomeri, protomeri), fiecare cu structura ei primară, secundară şi terţiară, într-o arhitectură spaţială complexă (oligomeri). Subunităţile componente ale unei macromolecule proteice cu structură cuaternară pot fi separate prin metode specifice, relativ blânde, fără ruperea vreunei legături covalente.

Stabilizarea structurii cuaternare se realizează prin formarea de interacţiuni între subunităţi, pe seama grupelor funcţionale libere ionizate, grupărilor hidrofobe, grupelor sulfhidrilice etc. Molecula tinde să formeze, atât în interiorul ei cât şi cu moleculele solventului, un număr de legături cât mai mare posibil, deci tinde spre un nivel minim al energiei libere şi o stabilitate maximă. Pentru majoritatea enzimelor, acest nivel minim de energie este atins spontan şi corespunde conformaţiei lor biologic active (fig. 23).

Unele enzime cu structură cuaternară prezintă activitate catalitică doar în forma oligomeră, în timp ce la altele, activitatea catalitică este decelată atât la forma nativă cât şi la subunităţile separate. Într-o enzimă oligomeră, subunităţile pot fi identice sau diferite. În general, enzimele sunt compuşi macromoleculari, cu masă moleculară extrem de variată care oscilează între 10.000 şi câteva milioane de daltoni (1 dalton = 1/12 din masa atomică a ^{12}C, adică $1{,}66.10^{-24}$ g).

Fiind proteine, enzimele prezintă toate proprietăţile fizico-chimice ale acestor compuşi printre care şi capacitatea de a precipita sub acţiunea unor factori specifici. În funcţie de comportarea moleculelor după îndepărtarea agentului precipitant, aceasta poate fi de două tipuri: precipitare reversibilă şi ireversibilă sau denaturare.

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

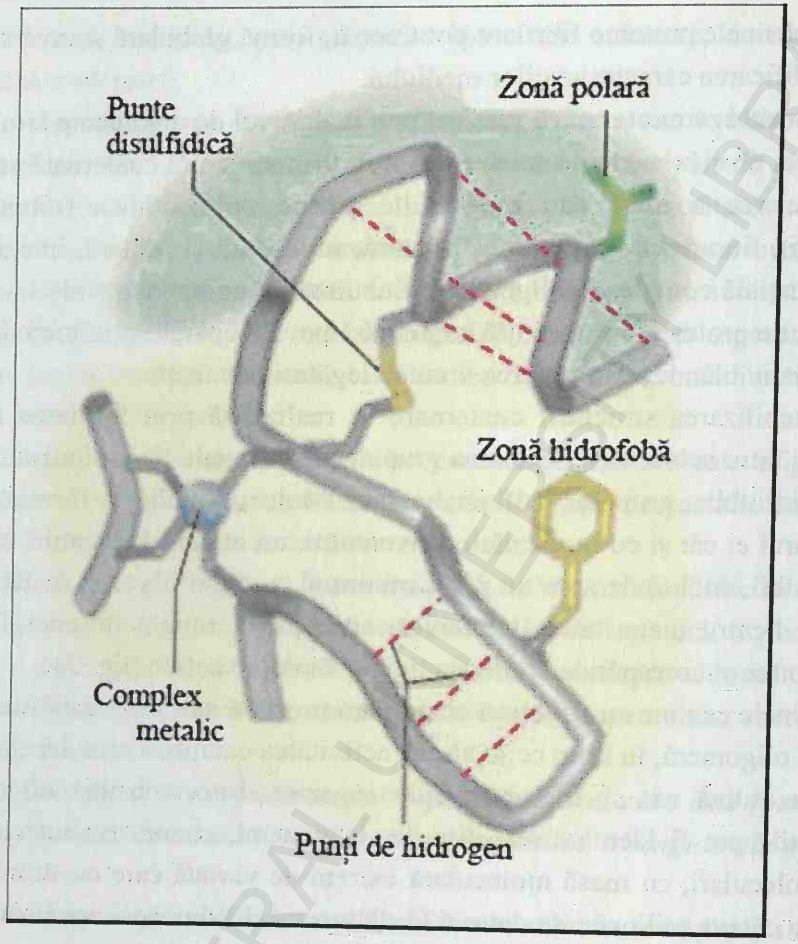


Fig 23. Reprezentarea schematică a interacțiunilor ce stabilizează structura cuaternară a proteinelor (Koolman, J. et al. – 2005).

Precipitarea reversibilă are loc atunci când, după îndepărtarea agentului precipitant (de exemplu prin dializă), enzima redevine solubilă. Această proprietate este utilizată frecvent în tehnicile de separare şi purificare a enzimelor din cele mai diferite surse biologice. În aceste tehnici, aproape întotdeauna se realizează în prima fază o precipitare fracționată a enzimelor prin utilizarea unor concentrații succesive ale agentului precipitant (sulfat de amoniu, etanol, acetonă, alcool izopropilic etc.). Enzimele astfel precipitate se separă apoi prin centrifugare sau filtrare după care se înlătură agentul precipitant prin diferite metode (dializă, diluție etc.) pentru a le redizolva.

Precipitarea ireversibilă sau ***denaturarea*** are loc atunci când enzima rămâne în stare solidă chiar şi după îndepărtarea agentului precipitant (uree, guanidină, dodecilsulfat de sodiu, valori extreme de pH, temperaturi ridicate etc.). De regulă, precipitarea este însoțită de pierderea completă a activității catalitice, motiv pentru care, denaturarea reprezintă principala modalitate de stopare a activității enzimatice *in vitro* în enzimologia practică.

III.3.3 Centrul activ al enzimelor

Cu unele excepții, masa moleculară a enzimelor este mult superioară maselor moleculare ale substratelor lor. Astfel, pentru marea majoritate a cazurilor, masele moleculare ale substratelor reprezintă cel mult 1 % din masele moleculare ale enzimelor ce catalizează transformarea lor. Pe de altă parte, multe enzime sunt heteroproteine, iar cofactorul enzimatic este implicat în actul catalitic (fig. 24). Ținându-se cont de aceste considerente, a fost enunțat următorul postulat asupra realizării procesului catalitic: ***"activitatea catalitică este realizată de o regiune mică din enzimă, geometric discretă, numită centrul activ sau situs catalitic (activ)"***.

Structura centrului activ este diferită de la o enzimă la alta şi depinde în mare măsură de structura macromoleculei enzimatice în ansamblu. Astfel la enzimele monocomponente, a căror moleculă este formată exclusiv din catene polipeptidice, centrul activ este alcătuit din resturi de aminoacizi localizate în zone extrem de diferite ale catenei (catenelor) polipeptidice dar care, în urma spiralizării şi plierii acestora pentru formarea structurilor de nivel superior, devin vecine, fiind grupate pe o arie cu diametrul de cel mult 30 Å.

Astfel, ***muramidaza*** este o enzimă a cărei moleculă este reprezentată de o singură catenă polipeptidică ce conține 129 resturi de aminoacizi. Centrul activ al acesteia este format din resturile Glu_{35} şi Asp_{52}. În cazul chimotripsinei, a cărei moleculă conține trei catene polipeptidice formate din 242 resturi de aminoacizi, centrul activ este alcătuit din resturile His_{57} şi Ser_{195} dintr-o catenă şi Asp_{102} din altă catenă polipeptidică.

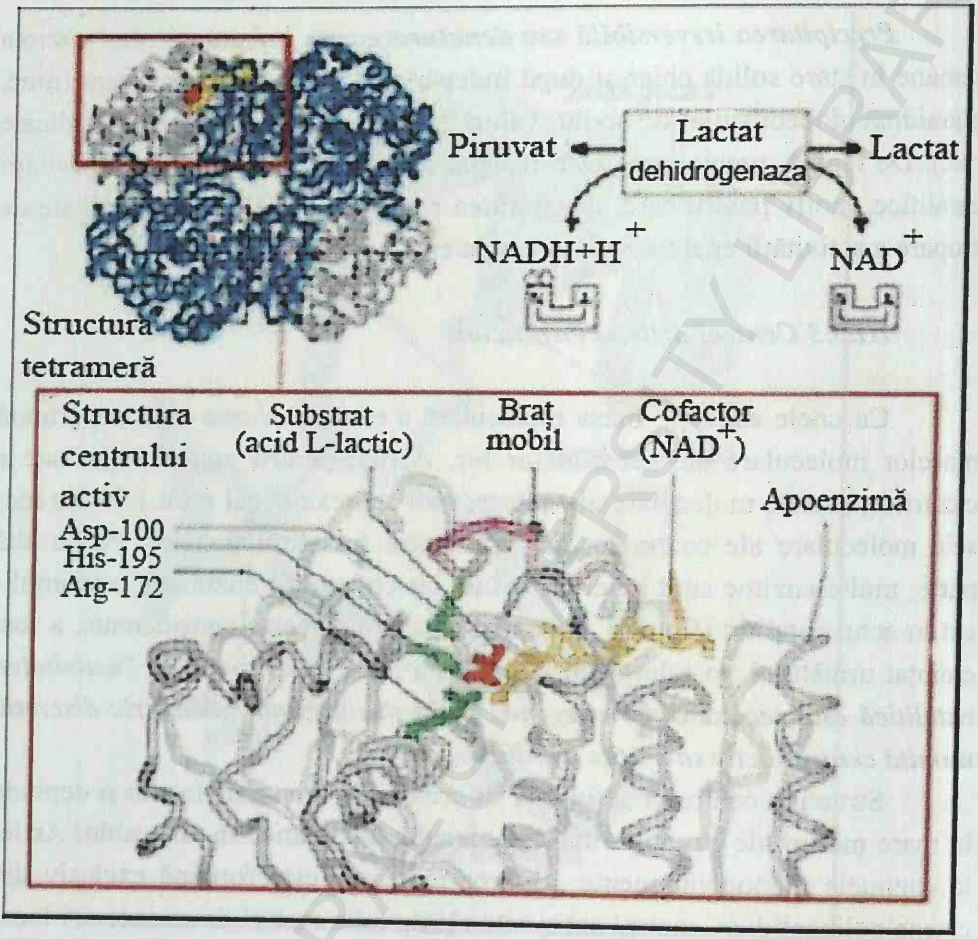


Fig. 24. Reprezentarea schematică a structurii spațiale a lactat-dehidrogenazei și localizarea centrului său activ (Koolman, J. et al. – 2005)

În cazul enzimelor bicomponente, cofactorul enzimatic face parte integrantă din structura centrului activ fie singur, fie, de cele mai multe ori, împreună cu unele resturi de aminoacizi din structura apoenzimei. De exemplu, în cazul carboxipeptidazei A, care este o metaloenzimă, situsul catalitic conține ionul Zn^{2+} și resturile de aminoacizi Arg_{145}, Tyr_{248} și Glu_{270}, apoenzima fiind alcătuită din 300 resturi de aminoacizi.

Deși centrul activ reprezintă zona din structura enzimei implicată direct în realizarea actului catalitic, toate segmentele din structura macromoleculei enzimatice participă, direct sau indirect, în realizarea transformării biobiochimice pe care aceasta o catalizează.

În funcție de rolul jucat în procesul catalitic, resturile de aminoacizi ce alcătuiesc catenele polipeptidice ale enzimelor monocomponente, precum și

cele ale apoenzimelor enzimelor bicomponente pot fi clasificate în mai multe grupe astfel:

- ***grupări de contact*** reprezentate de acele resturi de aminoacizi implicate direct atât în fixarea substratului în vederea formării complexului enzimă-substrat (ES) cât şi în realizarea actului catalitic. Aceste resturi sunt localizate în catenele polipeptidice în zone diferite dar, prin formarea structurilor de ordin superior, devin vecine;

- ***grupări conformaţionale***, adică.acele resturi de aminoacizi care nu fac parte din centrul activ, nefiind deci implicate direct în procesul catalitic, dar care asigură o conformaţie spaţială caracteristică fiecărei enzime, absolut necesară realizării procesului catalitic;

- ***grupări auxiliare*** sunt reprezentate de resturile de aminoacizi cu anumite proprietăţi fizico-chimice (de exemplu hidrofile sau hidrofobe), proprietăţi ce joacă un anumit rol în cataliză deşi nu participă direct în legarea substratului;

- ***grupări indiferente*** reprezentate de ceilalţi aminoacizi care nu participă în nici un fel la realizarea procesului catalitic, ele putând fi clivate sau înlocuite fără pierderea activităţii enzimatice. Deşi se numesc indiferente, aceste grupări conferă totuşi enzimelor anumite proprietăţi (solubilitate, stabilitate etc.) care facilitează acţiunea enzimei asupra substratului, atât *in vivo* cât şi *in vitro*.

Studiind cinetica reacţiilor enzimatice, *Michaelis* şi *Menten* propun următoarea formulare a reacţiilor enzimatice cu un singur substrat:

$$S + E \leftrightarrow ES \rightarrow P + E$$

Autorii postulează că reacţiile enzimatice decurg în două etape. În prima fază are loc o interacţiune reversibilă între enzimă (E) şi substratul său (S) cu formarea unui complex binar enzimă-substrat (ES) care ulterior a fost denumit ***complex Michaelis***. Acesta este instabil şi se transformă fie pe cale inversă cu regenerarea substratului şi a enzimei, fie cu formarea produsului de reacţie şi regenerarea catalizatorului.

În vederea formării complexului Michaelis, între enzimă şi substratul său pot lua naştere următoarele tipuri de legături:

- ***legături coordinative*** care apar în complecşii metaloenzimelor. Ele se realizează prin punerea în comun a electronilor neparticipanţi ai atomilor

de oxigen şi azot din apoenzimă şi reprezentă cele mai puternice legături ce se pot forma între enzimă şi substrat;

- ***legături de hidrogen*** care se formează între atomii de hidrogen şi atomii cu caracter electronegativ, în special cei de oxigen şi azot. În general, în timpul formării complexului Michaelis ia naştere un număr relativ mare de punți de hidrogen;

- ***atracții electrostatice*** care iau naştere datorită existenței unei grupe funcționale libere ce ionizează la pH fiziologic. Un rol important în realizarea acestor interacțiuni îl joacă, în primul rând, grupările aminice libere ale resturilor de lizină şi arginină şi grupările carboxilice ale resturilor acizilor aspartic şi glutamic;

- ***interacțiunile hidrofobe*** au loc cu precădere în cazul substratelor cu caracter hidrofob, iar apoenzimele participă în formarea acestor interacțiuni prin resturile aminoacizilor aromatici sau alifatici cu catenă lungă;

- ***transferul de sarcină*** se realizează atunci când substratul şi enzima posedă structuri bogate şi respectiv sărace în electroni.

II.3.4 Centrul alosteric. Enzime alosterice

Inițial, termenul de ***alosterie*** era atribuit fenomenului de modificare a conformației unei enzime ca urmare a interacțiunii sale cu o anumită substanță, legarea acesteia având loc într-o zonă diferită de situsul activ. În acest sens al noțiunii, alosteria a fost observată, de exemplu, în cazul acțiunii 2,3-difosfogliceratului asupra hemoglobinei, într-o zonă diferită de centrii de transport pentru oxigen. Mai exact, această substanță interacționează prin sarcinile sale negative cu atomii de azot de la capetele N-terminale ale catenelor.

În urma aprofundării cercetărilor de cinetică enzimatică, noțiunea de alosterie a căpătat noi înțelesuri. Clarificarea deplină a acestei noțiuni a fost posibilă datorită cercetărilor privind reglarea activității enzimelor *in vivo*, una din principalele particularități ale transformărilor biochimice.

Aceste transformări nu sunt de obicei formate dintr-o singură reacție enzimatică ci reprezintă succesiuni de reacții care alcătuiesc o aşa-numită ***cale*** sau ***secvență metabolică***:

$$S \xrightarrow{E_1} P_1 \xrightarrow{E_2} P_2 \xrightarrow{E_3} \text{----} \xrightarrow{E_n} P$$

În aceste secvențe, produsul reacției ce are loc sub acțiunea enzimei E_1 reprezintă substratul enzimei E_2 ş.a.m.d., iar produsul final P este considerat produsul căii metabolice date. În desfăşurarea acestor transformări, dacă produsul final P se acumulează într-o cantitate mai mare decât cea fiziologic normală, el inhibă activitatea enzimei E_1 care declanşează secvența metabolică respectivă, în aşa fel încât întreaga cale este stopată.

Acest tip de inhibiție diferă total de celelalte forme de inhibiție (vezi cap. IV) şi poartă numele de ***retroinhibiție sau inhibiție de tip feed back.*** Ea are loc în urma interacțiunii produsului final P cu o anumită zonă din geometria enzimei E_1 distinctă de centrul activ, zonă numită ***centru alosteric.*** În urma acestor interacțiuni este modificată conformația moleculei de proteină-enzimă, deci şi a centrului său activ, cu repercusiuni asupra capacității catalitice.

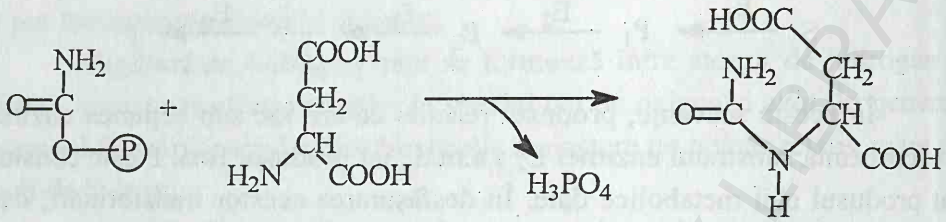
În momentul în care concentrația produsului final P scade ca urmare a transformării lui pe alte căi metabolice, enzima E_1 este dezinhibată, iar secvența se reia. Această proprietate de a fi inhibate prin *feed back* o au enzimele implicate în primele reacții ale unei secvențe metabolice, cel mai adesea enzima ce catalizează prima reacție. Acestea se numesc ***enzime alosterice*** şi îndeplinesc un rol extrem de important în capacitatea de reglare a activităților celulare.

Studiul enzimelor alosterice a demonstrat că ele prezintă unele proprietăți comune:

- prezintă structură cuaternară;
- nu respectă, de regulă, cinetica Michaelis-Menten (sunt ***enzime nemichaeliene***) (vezi cap. IV);
- pot suferi modificări conformaționale fără pierderea activității catalitice, aceste modificări fiind detectabile prin măsurători fizice sau cinetice;
- joacă, în general, un rol de reglare a metabolismului, în special în căile de biosinteză.

Una din primele enzime alosterice studiate a fost ***aspartat-transcarbamilaza*** din *Escherichia coli* (EC 2.1.3.2) ce catalizează reacția:

BCU CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY



carbamoil-fosfat aspartat carbamoil-aspartat

Aceasta este prima reacție dintr-o cale metabolică de biosinteză a nucleotidelor pirimidinice. Prin introducerea în mediul de fermentație cu *E. coli* a unei anumite cantități de CTP se obține blocarea activității aspartat-transcarbamilazei în timp ce introducerea de AMP sau ATP determină activarea enzimei.

Aspartat-transcarbamilaza a fost una din enzimele cele mai studiate sub aspectul efectului alosteric. Pentru elucidarea cineticii reacției catalizată de această enzimă au fost efectuate o serie de experimente complexe prin crearea diferitelor condiții de reacție în medii de incubare cu compoziție diferită, urmărindu-se de fiecare dată dependența v/[S] (*England, P.* et *Hervé, G.* – 1992).

Dacă se utilizează concentrații diferite de aspartat și se mențin constanți toți ceilalți parametri ai reacției se obține o curbă nemichaeliană a dependenței v/[S] (fig. 25). Această dependență sugerează faptul că în procesul de legare a aspartatului la centrul activ al enzimei apare clar un fenomen de ***cooperativitate.***

Prin repetarea experienței în același condiții, dar adăugând o cantitate dată de CTP, se observă un fenomen de inhibiție a activității enzimatice, în timp ce adăugarea unei cantități determinate de AMP sau ATP conduce la o activare a enzimei. Aceasta înseamnă că CTP-ul și ATP-ul acționează ca un modulator negativ și respectiv ca un modulator pozitiv.

Dacă enzima inhibată se tratează cu un reactiv specific tiolilor (de exemplu p-clormercuribenzoatul) ea se reactivează, iar comportamentul său cinetic redevine de tip michaelian, nemaifiind modulată de CTP sau ATP, adică este "desensibilizată".

BCU CENTRALA UNIVERSITY LIBRARY

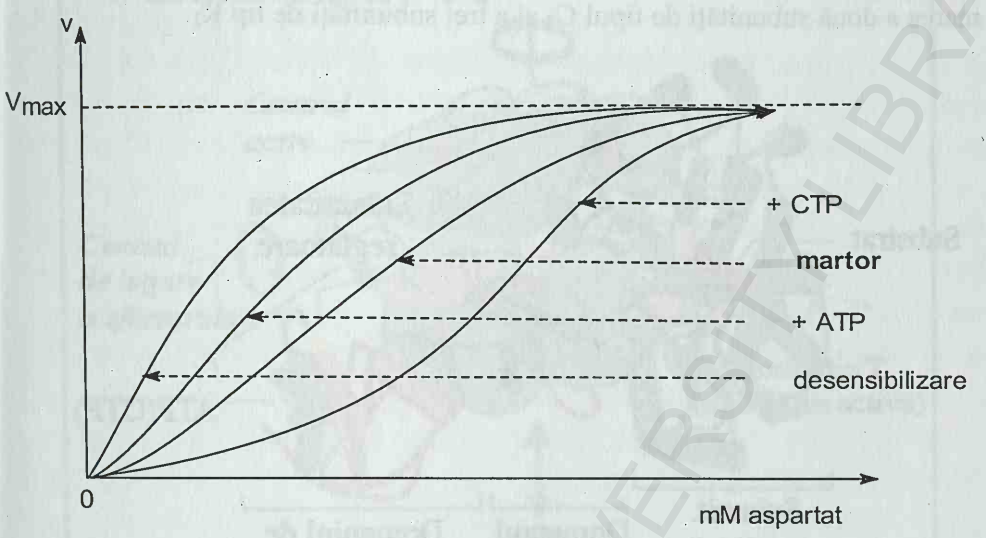


Fig. 25. Influența unor efectori asupra activității transcarbamilazei (England, P., Hervé, P. – 1992)

Se mai observă, de asemenea, că toate curbele v/[S] corespunzătoare condițiilor experimentale tind spre aceeași viteză maximă a cărei valoare nu este modificată de nici unul din efectorii utilizați. Concluzia firească este aceea că, în stare nativă, aspartat-transcarbamilaza nu își exprimă întregul său potențial catalitic. Trebuie deci să existe o piedică în exprimarea activității sale catalitice, piedică aflată sub controlul CTP și ATP.

Aspartat-transcarbamilaza este, de aceea, modulată de anumite semnale chimice care permit ajustarea activității sale în funcție de necesitățile de moment ale celulei.

Un exces de CTP inhibă enzima evitându-se astfel o "supraproducție" de nucleotide pirimidinice, în timp de UTP-ul anulează acest efect. Fenomenul de ***retroinhibiție*** (inhibiție de tip ***feed back***) exercitat de produsul final al acestei căi metabolice este posibil datorită existenței situsului alosteric în structura aspartat-transcarbamilazei.

Această enzimă alosterică are o structură cuaternară relativ complexă. Molecula sa conține 12 subunități, fiind de tipul C_6R_6. Subunitățile C (catalitice) au masele moleculare de câte 34 kDa, în timp ce subunitățile R (reglatoare) sunt mult mai mici, cu masele moleculare de doar 17 kDa, ceea ce conferă ansamblului cuaternar o masă moleculară de aproximativ 310 kDa (fig.

26). Disocierea parțială a acestei arhitecturi spațiale complexe are loc cu formarea a două subunități de tipul C_3 şi a trei subunități de tip R_2.

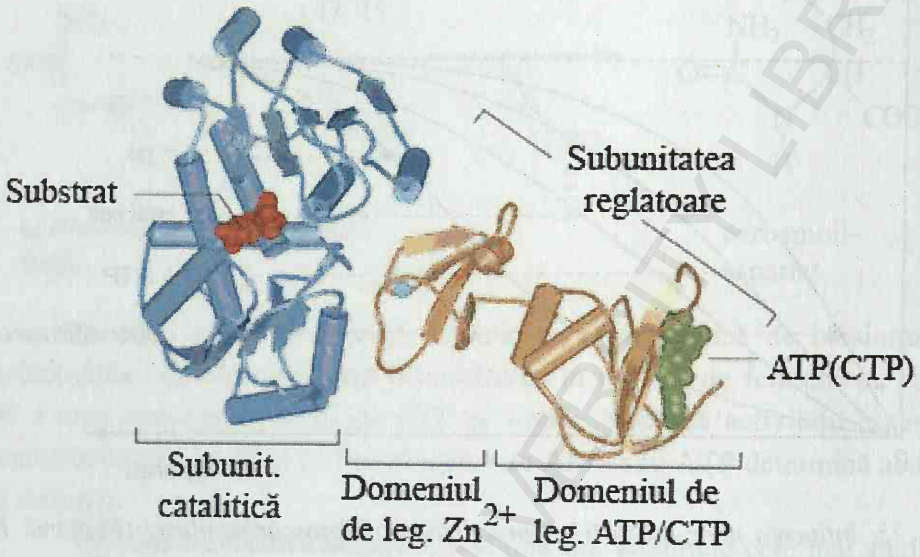


Fig. 26 Reprezentarea schematică a structurii cuaternare a aspartat-transcarbamilazei (Koolman, J. et al. – 2005)

Catenele catalitice C conțin două domenii, din care unul ecuatorial cu rol în recunoaşterea aspartatului, iar celălalt are un caracter polar şi are rolul de a lega radicalul fosfat din molecula carbamil-fosfatului. Aceeaşi structură o posedă şi subunitățile reglatoare R. Fragmentele C-terminale ale acestora interacționează cu subunitățile catalitice şi înglobează un ion de zinc necesar stabilizării structurii cuaternare, iar restul secvențelor conțin domeniile de recunoaştere a nucleotidelor.

Transcarbamilaza poate exista sub două forma conformaționale din care una (notată cu T) este mai puțin activă, iar cealaltă (notată cu R) este foarte activă (fig. 27).

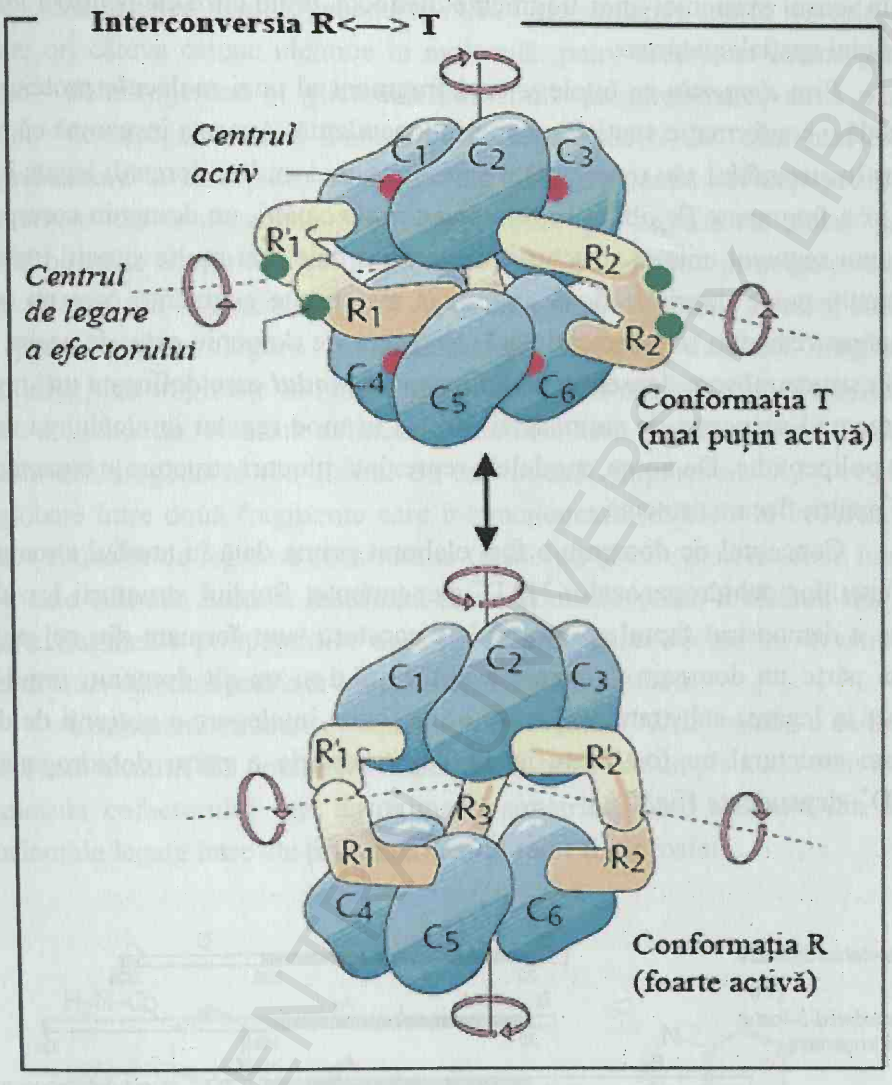


Fig. 27. Reprezentarea schematică a mecanismului interconversiei R↔T ale celor două conformații ale transcarbamilazei(Koolman, J. et al. – 2005)

II.3.5. Domenii structurale

Pentru majoritatea proteinelor oligomere, inclusiv pentru enzimele ce posedă structură cuaternară, este caracteristică capacitatea de a îndeplini mai multe funcții biologice sau capacitatea de a interacționa cu mai mulți compuși. Din aceste motive este logic ca structura acestor proteine să fie modula-

ră, în sensul existenței unor fragmente distincte, unite între ele pentru a forma edificiul spațial cuaternar.

Prin ***domeniu*** se înțelege acel fragment al unei molecule proteice ce posedă o conformație spațială relativ independentă. Aceasta înseamnă că proteina în ansamblul său reprezintă o asociere a mai multor domenii legate între ele prin fragmente flexibile. În cele mai simple cazuri, un domeniu corespunde unui segment unic al structurii primare. În cele mai multe situații însă un domeniu poate cuprinde două sau chiar mai multe segmente care nu sunt neapărat vecine în structura primară. Noțiunea de domeniu este, de aceea, de ordin structural spre deosebire de noțiunea de ***modul*** care definește un singur segment al secvenței de aminoacizi utilizat în mod repetat în alcătuirea unui lanț polipeptidic. De aceea, modulele reprezintă blocuri structurale caracteristice pentru fiecare proteină.

Conceptul de domeniu a fost elaborat prima dată în studiul structurii și funcțiilor dehidrogenazelor NAD^+–dependente. Studiul structurii lor chimice a demonstrat faptul că moleculele acestora sunt formate din cel puțin două părți: un domeniu de fixare a NAD^+–ului și un alt domeniu implicat direct în legarea substratului. Pentru o mai bună înțelegere a noțiunii de domeniu structural au fost luate în studiu structurile a patru dehidrogenaze NAD^+–dependente (fig. 28.)

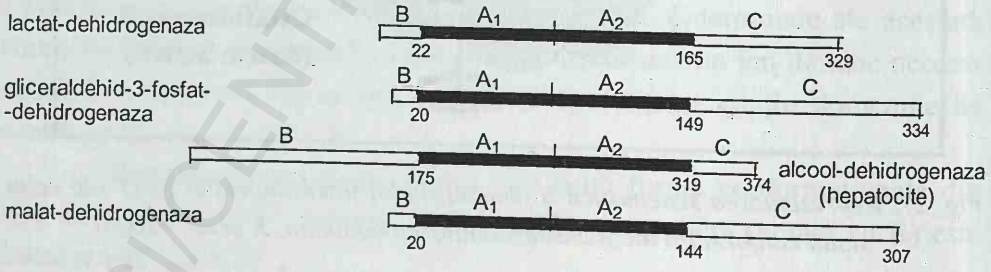
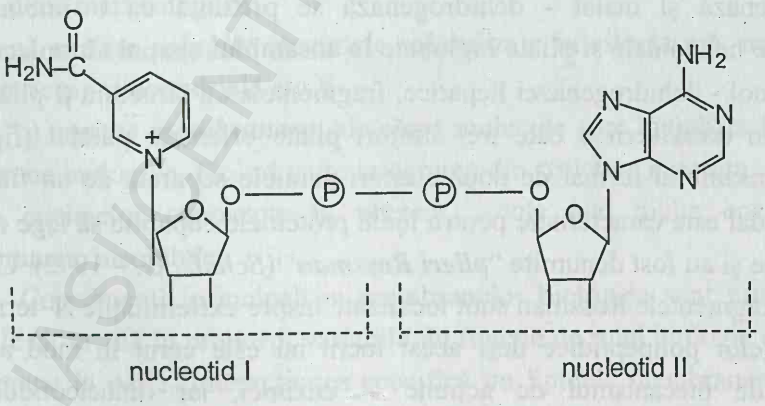


Fig. 28. Reprezentarea schematică a domeniilor structurale ale unor dehidrogenaze NAD^+–dependente (zonele A_1 și A_2 reprezintă domeniile de legare a NAD^+–ului) (Pelmont, J. – 1995)

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Majoritatea dehidrogenazelor NAD^+–dependente conțin de cele mai multe ori câteva catene identice în moleculă: patru asemenea catene pentru lactat - dehidrogenază şi gliceraldehidfosfat - dehidrogenază, două pentru malat - dehidrogenază etc. Domeniile de legare ale NAD^+–ului sunt foarte asemănătoare la cele patru enzime chiar dacă nu ocupă aceleaşi poziții în secvențele de aminoacizi. S-a concluzionat că moleculele celor patru dehidrogenaze conțin câte cel puțin două tipuri de domenii principale: domeniul alcătuit din fragmentele A_1 şi A_2 şi un domeniu specific fiecărei enzime în parte, necesar legării moleculelor de substrat. Celelalte fragmente peptidice sunt implicate în îndeplinirea altor roluri necesare funcționării normale a enzimelor. Această delimitare este însă ceva mai complicată în cazul alcool-dehidrogenazei din ficatul de cal întrucât fragmentele A_1 – A_2 sunt înglobate între două fragmente care interacționează între ele în vederea formării situsului de legare a substratului (etanolul) şi care sunt asociate într-un domeniu comun. Aceasta înseamnă că un domeniu poate fi alcătuit din mai multe fragmente polipeptidice care nu sunt neapărat vecine în secvența de aminoacizi dar care prezintă aceeaşi organizare modulară.

Examinând structura domeniului de legare a NAD^+–ului s-a constatat că el este alcătuit din două părți simetrice în raport cu un plan, aşa cum însăşi molecula cofactorului este aproximativ simetrică, fiind alcătuită din două nucleotide legate între ele prin intermediul radicalilor fosfat:



BCU IASI CENTRUL DE CARTE

Procesul de legare a NAD^+–ului la nivelul situsului de legare din molecula enzimei constă în încorporarea dinucleotidului la nivelul fragmentelor $A_1 - A_2$ care formează domeniul de legare.

Elemente similare se regăsesc şi în structura altor proteine care au drept caracteristică comună capacitatea de a lega diferite nucleotide, cum ar fi de exemplu ***kinazele***, enzime ce folosesc ATP-ul în calitate de donor de energie şi radicali fosfat.

În cazul dehidrogenazelor NAD^+– dependente, fragmentele A_1 şi A_2 pot fi considerate ca fiind subdomenii ce conţin câte un situs de recunoaştere a câte unui nucleotid, iar prin suprapunerea lor se creează posibilitatea legării dinucleotidului (NAD^+) în ansamblu.

Fiecare dehidrogenază posedă un model structural care este bine conservat într-un număr foarte mare de specii de vieţuitoare. Acest lucru reprezintă un exemplu concret al unui fenomen întâlnit des în lumea vie când diferite familii de enzime, odată constituite, au rezistat modificărilor majore cauzate de selecţia naturală.

Cercetările asupra domeniilor structurale au inclus şi aspectele legate de modul în care se localizează aceste fragmente peptidice în procesul formării structurilor de ordin superior ale enzimelor. Din acest punct de vedere, domeniile pot fi considerate ca fiind asocieri într-un mod bine determinat ale mai multor structuri secundare de tip α-helicoidal şi/sau β-pliat. De exemplu, domeniul de legare a NAD^+–ului din lactat - dehidrogenază şi malat - dehidrogenază se prezintă ca o îmbinare de fragmente helicoidale şi pliate înglobate în ansamblul spaţial al moleculei. În cazul alcool - dehidrogenazei hepatice, fragmentele cu structură β-pliată sunt dispuse în două serii a câte trei straturi pliate orientate paralel (fig. 29).

Ansamblul format de două straturi paralele separate de un fragment α-helicoidal este caracteristic pentru toate proteinele capabile să lege diferite nucleotide şi au fost denumite "***plieri Rossman***" (*Schulz, G.* – 1992). Cel mai adesea, fragmentele Rossman sunt localizate înspre extremităţile N–terminale ale catenelor polipeptidice deşi acest lucru nu este cerut în mod absolut necesar de mecanismul de acţiune al enzimei, iar dinucleotidul este întotdeauna legat de către capătul C–terminal al straturilor β-pliate. S-a constatat, de asemenea, că cele două subdomenii A_1 şi A_2 care corespund domeniului de recunoaştere a dinucleotidului, sunt orientate în sens invers unul faţă de celălalt, în mod similar cu orientarea celor două nucleotide ce

alcătuiesc molecula de NAD^+.

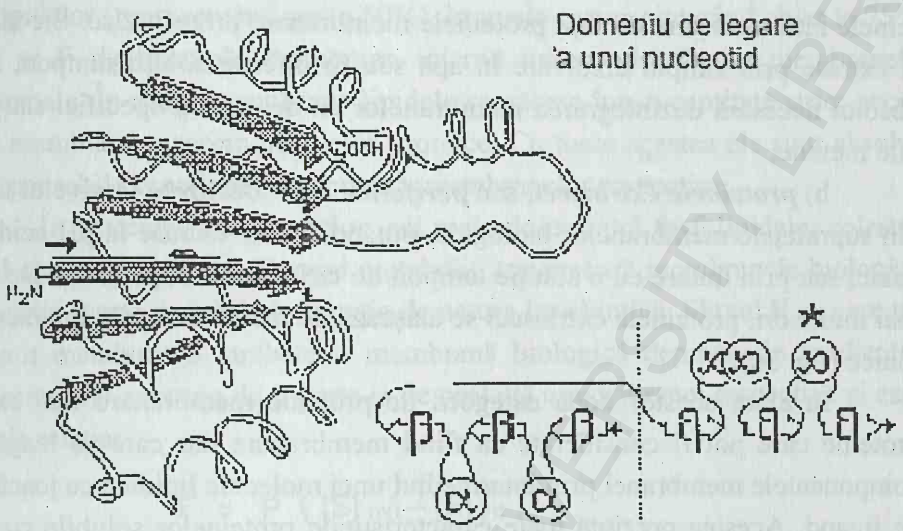


Fig. 29. Orientarea spațială a domeniilor structurale ale alcool-dehidrogenazei hepatice (Schulz, G. – 1992)

II.3.6. Enzime membranare

Din punctul de vedere al localizării lor intracelulare, enzimele se împart în două mari categorii:

a) ***enzime solubile*** (enzimele solubilizate în citoplasmă, nucleoplasmă, matricea mitocondrială etc.);

b) ***enzime membranare***, ale căror molecule sunt înglobate în diferite membrane biologice, făcând parte integrantă din structura acestora. Din totalitatea enzimelor cunoscute în prezent, cele mai multe enzime sunt membranare, insolubile.

Constituenții principali ai membranelor biologice sunt proteinele și lipidele ce se află în proporții variabile, în funcție de rolul biologic al fiecărei membrane în parte. Interacțiunea specifică cu lipidele membranare conferă proteinelor o serie de caracteristici speciale. În funcție de localizare și de modul de interacțiune cu lipidele membranare, proteinele membranare sunt, la rândul lor, de două tipuri:

BCU "VASILE GOLDIȘ" UNIVERSITY LIBRARY

a) ***proteinele intrinseci*** sunt asociate cu lipidele şi intră în constituţia propriu-zisă a membranei, făcând parte integrantă din structura acesteia. Proteinele intrinseci sunt de fapt proteinele membranare propriu-zise. Ele nu pot fi extrase prin simpla dizolvare în apă sau în diferite soluţii tampon, fiind absolut necesară dezintegrarea membranelor cu detergenţi specifici sau prin alte metode;

b) ***proteinele extrinseci***, sau ***periferice*** sunt localizate la nivelul uneia din suprafeţele membranelor biologice, putând fi uşor extrase la pH acid sau bazic, sau prin tratare cu o soluţie tampon de tărie ionică superioară. De cele mai multe ori, proteinele extrinseci se ataşează de membrană prin interacţiuni ionice (fig. 30).

În afara acestor două categorii de proteine membranare mai există proteine care pot fi considerate ca fiind membranare dar care se leagă de componentele membranei prin intermediul unei molecule lipidice ce joacă rol de ligand. Acestea prezintă toate caracteristicile proteinelor solubile cu excepţia faptului că se leagă covalent de un rest de acid gras sau de un rest fosfolipidic prin intermediul cărora au posibilitatea de a se ataşa de faza lipidică a membranei.

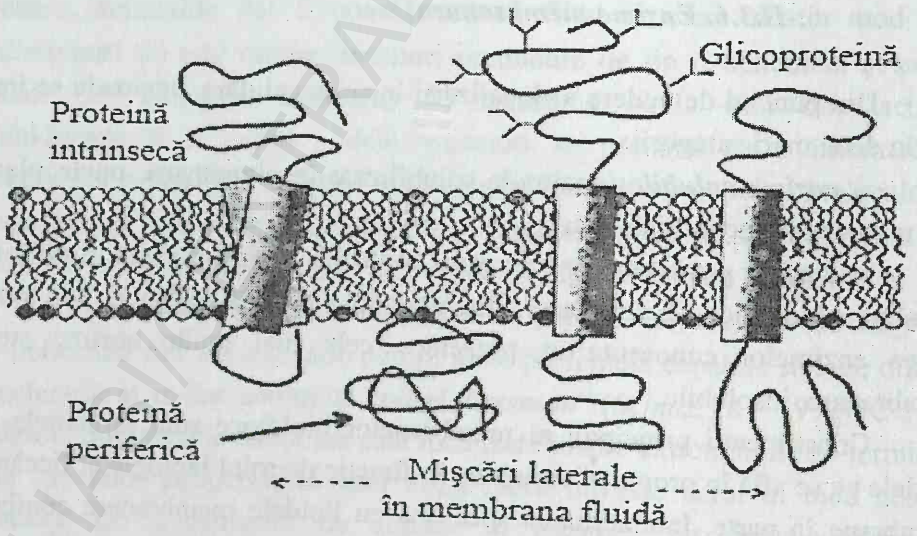


Fig. 30. Reprezentarea schematică a localizării proteinelor membranare (Pelmont, J. – 1995)

Cu excepția membranelor mielinice, în care ponderea lipidelor depășește 80%, în toate celelalte membrane biologice proteinele depășesc ponderea lipidelor (reprezentând peste 50%), în unele cazuri ajungând chiar la 75% cum ar fi de exemplu membrana internă mitocondrială sau membranele lisosomale. În aceste membrane lipidele se găsesc într-o cantitate strict necesară asamblării macromoleculelor proteice. Cu toate acestea ele sunt absolut indispensabile funcționării normale a membranelor respective.

În structura membranelor, cel mai adesea intră fosfolipidele, colesterolul și esterii acestuia. Diverși metaboliți traversează membranele biologice cu viteze foarte variabile în funcție de natura lor chimică. Fluxul F cu care un anumit metabolit S străbate o membrană biologică depinde de gradientul concentrației acestuia de o parte și de cealaltă a membranei respective și este dat de relația:

$$F = P\ ([S]_{ext} - [S]_{int})$$

unde:

F – fluxul de permeabilitate;

P – constantă de permeabilitate (cm/sec);

$[S]_{ext}$ – concentrația metabolitului S la suprafața externă a membranei;

$[S]_{int}$ – concentrația metabolitului S la suprafața internă a membranei.

Metaboliții polari prezintă un coeficient P foarte mic deoarece traversarea stratului lipidic al membranei necesită pierderea apei de solvatare, fenomen ce reprezintă o barieră energetică majoră. Cu toate acestea, există diferențe foarte mari de la un tip de ion la altul. De exemplu anionii Cl^- traversează membranele cu viteze de 20 – 50 de ori mai mari decât cationii Na^+ și K^+. Metaboliții hidrofobi prezintă coeficienți de permeabilitate P de $10^5 – 10^7$ ori mai mari decât coeficientul specific ionului de clor. Datorită caracterului său parțial bipolar (dipol) și masei moleculare mici, apa străbate membranele biologice prin difuzie. Viteza de difuzie a apei este însă diferită, fiind foarte scăzută pentru celulele din țesuturile care realizează un schimb de apă cu exteriorul: epiteliul renal, eritrocitele, stomatele, celulele radiculare etc. Membranele acestor celule conțin o serie de proteine speciale numite ***acvaporine*** (*aquaporine*) care au capacitatea de a regla tranzitul la nivelul porilor acestor membrane.

Difuzia liberă prin membranele biologice este mai rar întâlnită din cauza vitezelor, în general mici, cu care metaboliții respectivi realizează

această trecere. Marea majoritate a metaboliților realizează un ***transport activ*** care presupune transportul metabolitului respectiv printr-o membrană contra gradientului concentrației sale, cu consum de energie. Acest tip de transport este posibil datorită existenței unor proteine speciale numite ***transportori*** care pot fi enzime sau proteine ce prezintă o mare analogie cu enzimele. În primul rând, transportorii membranari prezintă specificitate față de unul sau un număr restrâns de metaboliți pe care îi transportă. Rolul transportorilor este acela de a micșora bariera energetică care frânează traversarea membranei de către un solut. În cazul moleculelor polare și a ionilor, transportorii au rolul de a proteja porii hidrofili prin care se realizează transportul.

Transportorii ce realizează acest mecanism poartă numele de ***porine*** și se întâlnesc, de exemplu, în membrana externă a bacteriilor Gram-negative. Aceștia realizează transportul activ prin mecanisme mult mai complexe. Porinele cele mai intens studiate sunt ***permeazele***, enzime implicate în transportul activ al glucidelor. O permează interacționează în mod specific cu substratul său la nivelul uneia din suprafețele membranei, legarea făcându-se după principiul general de interacțiune dintre o enzimă și substratul său natural. Principala diferență constă în faptul că metabolitul ce urmează a fi transportat nu suferă nici o modificare în timpul existenței sale sub formă legată de transportor.

În studiul enzimelor membranare, de o atenție deosebită se bucură analiza structurii chimice și a mecanismului de acțiune al citocromilor, enzime implicate în transportul electronilor în procesul respirației (la nivel mitocondrial) și respectiv în fotosinteză (la nivelul tilacoizilor din cloroplaste). Aceste proteine conțin un ion de fier înglobat în hem (Fe^{2+}), respectiv hemină (Fe^{3+}). Majoritatea citocromilor sunt enzime membranare cu excepția câtorva, cum ar fi citocromul c din mitocondrii. În cele ce urmează vom analiza structura chimică și mecanismul de acțiune ale citocromilor, atât al celor de origine animală, cât și al celor de origine vegetală sau microbiană, luând drept exemplu citocromul b.

La nivel mitocondrial, citocromul b face parte dintr-un complex cunoscut sub numele de ***citocrom bc_1*** sau ***complex III*** alături de alte proteine membranare. Prin compararea structurilor primare ale citocromilor b din diferite surse biologice s-a constatat conservarea mai multor fragmente structurale de-a lungul evoluției, fragmente responsabile probabil de o serie de caractere structurale importante. Până în prezent au fost bine studiați mai mulți

citocromi b mitocondriali (la om, bou, şoarece, porumb, drojdii, *Aspergillus* etc.), precum şi citocromul b din cloroplastele de spanac. Astfel, citocromul b_6 are o masă moleculară de 23,4 kDa şi conţine în moleculă 211 resturi de aminoacizi (*Cramer, J. et al.* – 1983). Molecula sa conţine două grupe heminice legate de catenele polipeptidice probabil la nivelul unor resturi de histidină (fig. 31).

Identificarea resturilor de histidină de care se leagă cofactorul heminic a fost făcută relativ uşor întrucât componenta proteică conţine doar cinci asemenea resturi, din care patru sunt înglobate în fragmentele helicoidale. La prima vedere ne-am aştepta ca toate situsurile hidrofobe să fie localizate în fragmentele α-helicoidale.

O analiză mai amănunţită a arhitecturii structurale arată însă că repartiţia zonelor hidrofobe şi hidrofile este mult mai complexă. Clarificarea acestui aspect a fost mult facilitată de analiza comparativă a diferiţilor citocromi b şi evaluarea gradului de analogie structurală. Citocromul b_6 este foarte apropiat din punctul de vedere al secvenţei de aminoacizi de citocromul b mitocondrial. S-a observat că grupele ionice sunt absente în fragmentele helicoidale cu excepţia câte unui rest de arginină, aspartat şi glutamat şi a patru resturi de histidină.

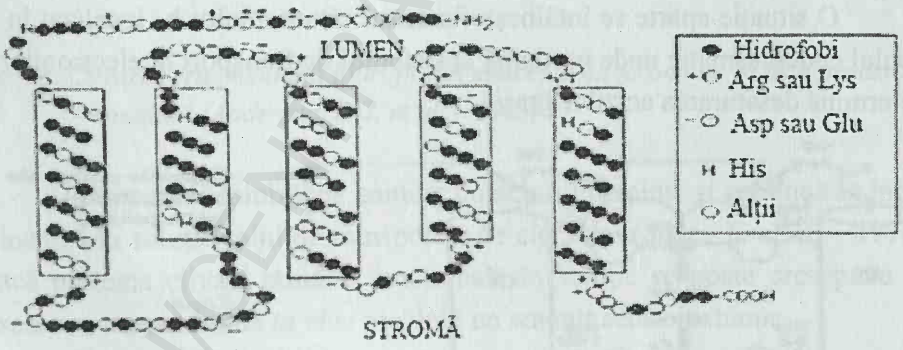


Fig. 31. Reprezentarea schematică a structurii primare a citocromului b_6 (Cramer, J. et al.- 1983)

Asupra existenţei acestor situsuri polare în interiorul fragmentelor helicoidale au fost emise următoarele ipoteze:

a) situsul polar este localizat într-un micromediu hidrofob ceea ce conduce la o creştere a valorii constantei sale de aciditate pKa (în cazul resturilor de acid glutamic şi histidină);

b) situsul polar este localizat la nivelul suprafeţei de contact dintre două fragmente helicoidale, departe de punctele de interacţiune cu fosfolipidele, formând o punte ionică între helix-uri;

c) situsul polar este implicat în formarea unor legături speciale (în cazul resturilor de histidină).

Valoarea pKa caracteristică restului de histidină este de aproximativ 7,0. În acest caz, cele patru resturi de histidină nu sunt ionizate şi joacă rol de donori în legarea fierului heminic. Acest mod de legare a nucleului heminic între două fragmente helicoidale a fost clarificat de către *Anderson, D. J. et al.* în 1983 (fig. 32).

Cele două nuclee heminice din citocromul b_6 sunt fixate între fragmentele helicoidale 1 şi 4 de către cele patru resturi de histidină. Resturile polare de arginină de la extremităţile fragmentelor helicoidale 2 şi 5 formează legături ionice cu radicalii propionil ai nucleelor heminice. O astfel de localizare se pare că este întâlnită la majoritatea citocromilor din mitocondrii. La plante, în cadrul fotosistemului II din cloroplaste există un alt citocrom b (citocromul b_{559}) care are probabil o structură asemănătoare.

O situaţie aparte se întâlneşte în cazul citocromului b_5 localizat în reticulul endoplasmatic unde participă la sistemul de transport al electronilor ce determină desaturarea acizilor graşi.

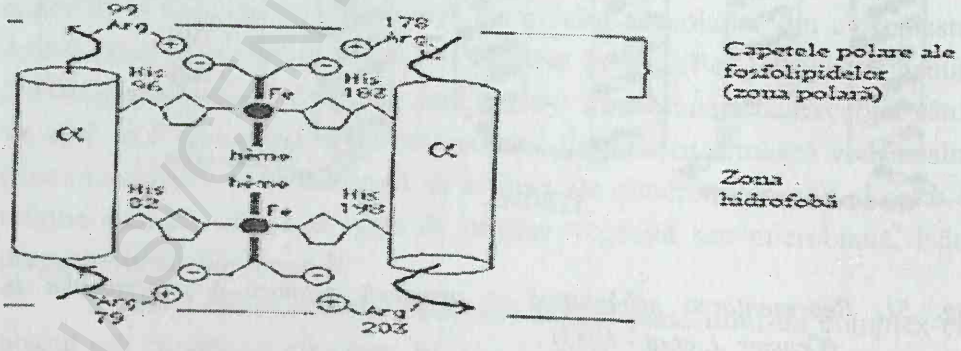


Fig. 32. Legarea nucleului heminic de apoenzimă în molecula citocromului b_5 (Anderson, D.J. et al. – 1983)

Componenta proteică a acestuia conține 133 resturi de aminoacizi și are o masă moleculară de 16 kDa. Molecula sa se fixează de membrană la nivelul unei singure secvențe hidrofobe din apropierea extremității C–terminale (secvența 105 – 125), restul moleculei având caracter hidrofil și fiind orientat în afara membranei, spre citosol.

Datorită acestei localizări asimetrice, citocromul b_5 poate fi considerat ca fiind o proteină membranară intrinsecă, pentru solubilizarea sa fiind necesară tratarea fracțiunii membranare cu un detergent adecvat.

O altă procedură constă în realizarea unei proteolize limitate care conduce la clivarea fragmentului hidrofil ce conține aproximativ 90 de resturi de aminoacizi (M ~ 11 kDa), fragment ce devine solubil, în timp ce fragmentul hidrofob rămâne legat de membrană (fig. 33).

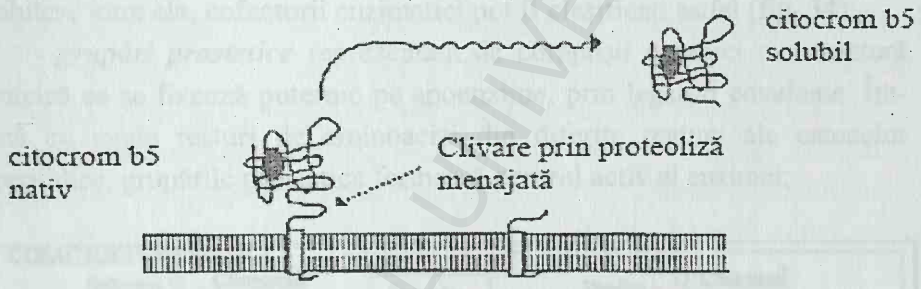


Fig. 33. Clivarea fragmentului hidrofil din molecula citocromului b_5 prin proteoliză menajată (Anderson, D.J. et al. – 1983)

Fragmentul solubilizat conține cofactorul heminic și continuă să îndeplinească în soluție rolul de transportor de electroni (*Spatz, L. et al.* – 1971). Dacă proteina clivată rămâne funcțională în soluție se poate presupune că fixarea sa la membrană *in vivo* prezintă un anumit sens biochimic.

Citocromul b_5 primește un electron sub acțiunea unei reductaze specifice care, de asemenea, este o enzimă membranară. Ea se fixează de membrană prin intermediul secvenței sale N–terminale (ce conține 28 resturi de aminoacizi) la nivelul unui rest de acid gras (*Bryan, B.* – 1992).

Atât citocromul b_5 cât și reductaza sa nu sunt asociate în mod permanent cu membrana reticulului endoplasmatic ci difuzează lateral în membrană, iar transferul de electroni se face în momentul întâlnirii celor două enzime

în timpul difuziei, activitățile lor catalitice fiind date de fragmentele lor hidrofobe.

BCU IAȘI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

III. COENZIME

III.1 GENERALITĂȚI

După cum s-a arătat în capitolul II, din punct de vedere structural, enzimele cunoscute în prezent pot fi grupate în doua clase distincte: enzime monocomponente şi enzime bicomponente. Cele mai multe enzime sunt heteroproteine; aceasta înseamnă că moleculele lor, pe lângă componenta proteică, numită ***apoenzimă***, mai conține şi o componentă de altă natură numită ***cofactor enzimatic***. Cele două componente pot interacționa diferit în funcție de structura lor chimică, iar în funcție de natura legăturilor chimice ce se stabilesc între ele, cofactorii enzimatici pot fi clasificați astfel (fig. 34):

- ***grupări prostetice*** reprezentate de compuşii organici cu structură neproteică ce se fixează puternic pe apoenzime, prin legături covalente. Împreună cu unele resturi de aminoacizi din diferite regiuni ale catenelor polipeptidice, grupările prostetice formează centrul activ al enzimei;

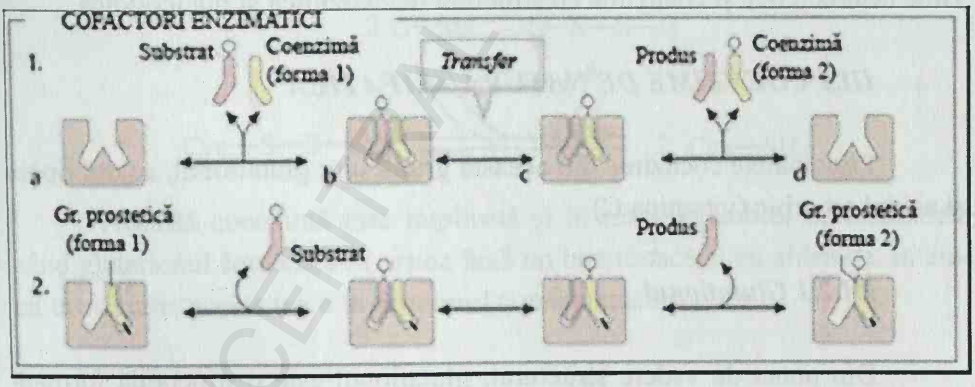


Fig. 34. Principiile generale de acțiune ale coenzimelor şi grupărilor prostetice (Koolman, J. et al. – 2005)

- ***coenzimele*** sunt reprezentate de anumiți compuşi organici ce interacționează slab cu apoenzimele. În acest caz, între cele două componente se formează legături slabe de tipul punților de hidrogen, interacțiunilor hidrofobe etc., iar coenzimele pot fi separate relativ uşor de apoenzime, de exemplu prin dializă. Cele mai multe coenzime sunt cofactori ai transferazelor, iar

reacțiile catalizate decurg, în general, în doua etape: în prima fază gruparea funcțională sau radicalul ce urmează a fi transferat se leagă de coenzimă, iar în etapa următoare aceasta o cedează celuilalt substrat.

Deşi această clasificare se face în funcție de tăria legăturilor dintre cele două componente, acelaşi cofactor se poate lega în mod diferit de diverse apoenzime. Din această cauză nu se poate face o delimitare netă între coenzime şi grupări prostetice, adică acelaşi cofactor poate fi coenzimă pentru o enzimă şi grupare prostetică pentru alta. De exemplu, FAD-ul este grupare prostetică pentru lipoamid-dehidrogenază şi respectiv coenzimă pentru D-aminoacid-oxidaze.

Există situații când cofactorul enzimatic poate juca rol de cosubstrat în anumite etape ale unei secvențe metabolice, urmând ca el să se regenereze în etapele următoare sau în reacții din alte secvențe. Din aceste motive, în cele ce urmează vom folosi termenul de ***coenzimă*** chiar dacă în unele situații substanțele respective sunt grupări prostetice.

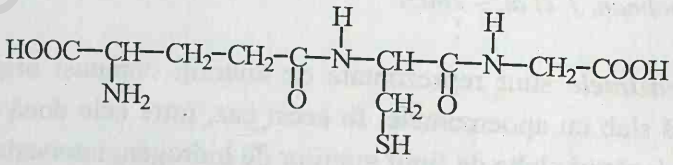
Coenzimele alcătuiesc o grupă de substanțe extrem de heterogenă structural. Din acest punct de vedere, coenzimele se împart în patru clase principale: coenzime de natură alifatică, coenzime de natură aromatică, coenzime heterociclice şi coenzime cu structură nucleozidică şi nucleotidică.

III.2 COENZIME DE NATURĂ ALIFATICĂ

Principalele coenzime din această grupă sunt glutationul, acidul lipoic şi acidul ascorbic (vitamina C).

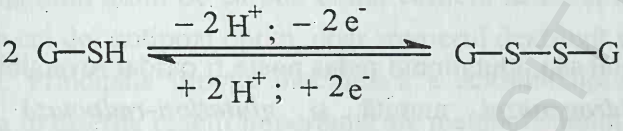
III.2.1 Glutationul

Din punct de vedere structural, glutationul este o tripeptidă formată dintr-un rest de acid L-glutamic, unul de L-cisteină şi un rest de glicocol:



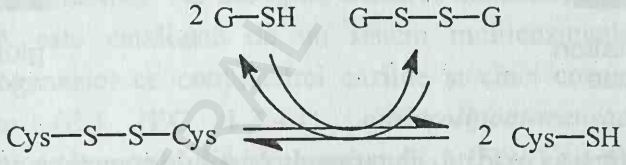
glutation (glutamil-cisteinil-glicina)

Glutationul a fost descoperit încă la sfârşitul secolului XIX (*Rey-Pailhade*, 1888) şi este o substanţă foarte răspândită în natură, întâlnindu-se în toate celulele vii. Activitatea biologică a glutationului este asigurată de prezenţa grupării sulfhidril a restului de cisteină, grupare ce poate fi oxidată reversibil. Astfel, glutationul redus (notat G-SH) poate fi oxidat sub acţiunea ***glutation-dehidrogenazei*** în prezenţa acidului dehidroascorbic :

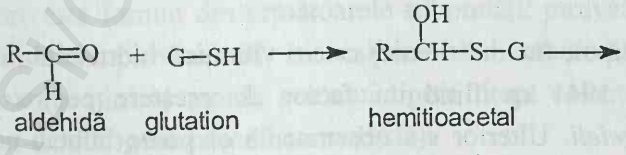


glutation redus — glutation oxidat

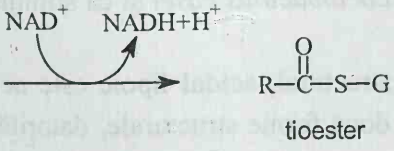
Această proprietate a glutationului de a se oxida reversibil face ca acesta să reprezinte cofactorul unor oxidoreductaze. De exemplu, formarea punţilor disulfidice prin conversia cisteinei în cistină, are loc sub acţiunea ***glutation-homocistin-transhidrogenazei*** care este o enzimă glutation-dependentă:



Această coenzimă este implicată şi în reacţiile tiolilor cu aldehidele când glutationul formează în prima fază un hemitioacetal cu aldehida. În etapa următoare, acesta trece în tioesterul corespunzător:

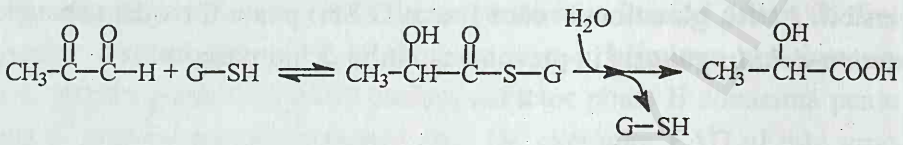


aldehidă — glutation — hemitioacetal

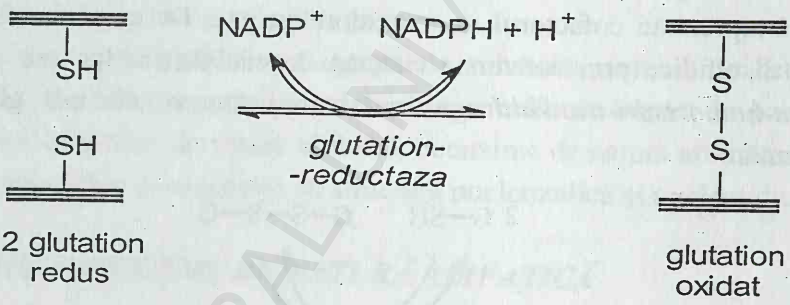


tioester

Sub acțiunea ***glioxilazei***, care este o enzimă glutation–dependentă, are loc transferul intramolecular al hidrogenului în procesul de conversie a metilglioxalului în acid lactic:



La rândul său, glutationul redus poate fi oxidat reversibil sub acțiunea ***glutation-dehidrogenazei*** numită și ***glutation-reductază*** (***NADPH : glutation oxidat-oxidoreductaza***, EC 1.6.4.2). În această reacție, cofactorul enzimatic (NADPH-ul) joacă atât rol de coenzimă cât și de cosubstrat:



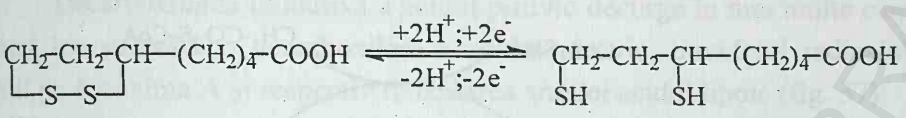
Sub forma sa oxidată, glutationul constituie coenzima unor izomeraze, cum ar fi cele care realizează conversia fenilpiruvatului din forma cetonică în cea enolică și respectiv a acidului maleic în acid fumaric.

III.2.2 Acidul lipoic

Acidul lipoic (acidul tioctic) este o vitamină hidrosolubilă care a fost descoperită în 1941 ca fiind un factor de creștere pentru protozoarul *Tetrahymana geleii*. Ulterior s-a observat că el poate înlocui acidul acetic necesar creșterii celulelor de *Lactobacillus casei* și că stimulează creșterea la *Streptococcus lactis*.

Din punct de vedere structural, acidul lipoic este acidul 6,8-ditio-n-octanoic ce poate exista sub două forme structurale, datorită prezenței celor două grupe -SH:

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY



acid α-lipoic (forma oxidată) acid α-lipoic (forma redusă)

Prezența unui atom de carbon chiral conferă acidului lipoic izomerie optică, dar din cei doi antipozi optici, doar izomerul dextrogir prezintă activitate biologică. Principala funcție biochimică a acidului lipoic o constituie participarea sa în diferite reacții importante ale metabolismului intermediar în calitate de coenzimă a unor oxidoreductaze:

- dehidrogenarea unor cetoacizi (acidul piruvic, acidul α-cetoglutaric, cetoacizii rezultați în urma transaminării aminoacizilor cu catenă ramificată etc.);
- biosinteza și degradarea glicocolului;
- biosinteza prostaglandinelor.

a) ***Dehidrogenarea α-cetoacizilor*** este o transformare importantă din metabolismul intermediar. De exemplu, oxidarea acidului piruvic cu formare de acetil-CoA este catalizată de un sistem multienzimatic (complexul piruvatdehidrogenazic) ce conține trei enzime și cinci coenzime: ***piruvat-dehidrogenaza*** (E_1) (EC 1.2.4.1), ***dihidrolipoat-transacetilaza*** (E_2) (EC 2.3.1.12) și ***lipoamid-dehidrogenaza*** (E_3) (EC 1.8.1.4) și respectiv ***tiaminpirofosfatul, acidul lipoic, coenzima A, FAD*** și ***NAD*** (fig. 35).

Decarboxilarea oxidativă a acidului piruvic este o transformare ireversibilă în toate țesuturile animale, fiind o etapă obligatorie în cuplarea căii glicolitice cu ciclul acizilor tricarboxilici. Complexul enzimatic izolat din inima de porc este format din următoarele subunități: piruvat-dehidrogenaza (ce conține tiaminpirofosfatul în calitate de cofactor), dihidrolipoat-transacetilaza (conținând amida acidului lipoic drept cofactor) și respectiv dihidrolipoat-dehidrogenaza (cofactor - FAD).

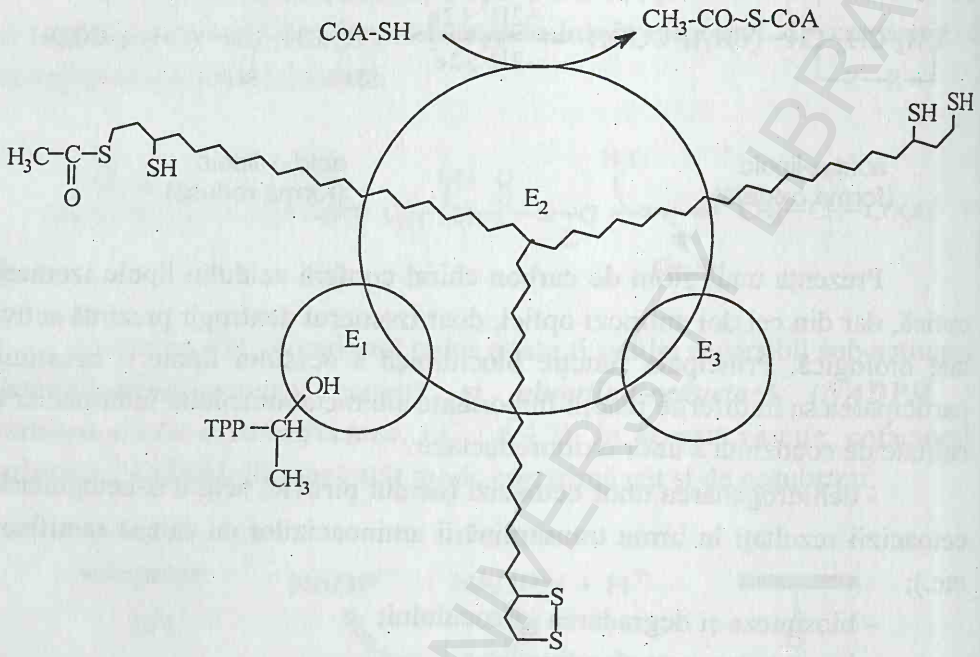


Fig. 35. Schema acțiunii complexului piruvat-dehidrogenazei mitocondriale în procesul decarboxilării oxidative a acidului piruvic

Ceilalți doi cofactori (NAD^+ și CoA-SH) fac parte din complexul enzimatic fără a fi legați de vreuna din cele trei enzime. Acidul lipoic este legat covalent la nivelul grupării ε-amino libere a unui rest de lizină din secvența polipeptidică a apoenzimei sale (fig. 36).

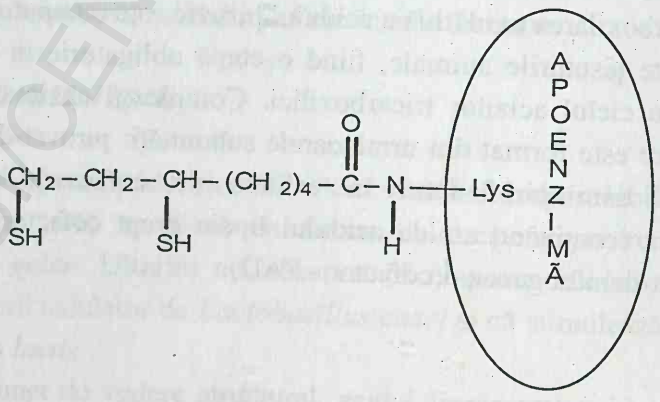


Fig 36. Legarea acidului lipoic de apoenzima dihidrolipoat-transacetilazei

BCU IAȘI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Decarboxilarea oxidativă a acidul piruvic decurge în mai multe etape, având loc succesiv o decarboxilare a acidul piruvic, transferul radicalului acetil pe coenzima A şi respectiv reoxidarea amidei acidul lipoic (fig. 37):

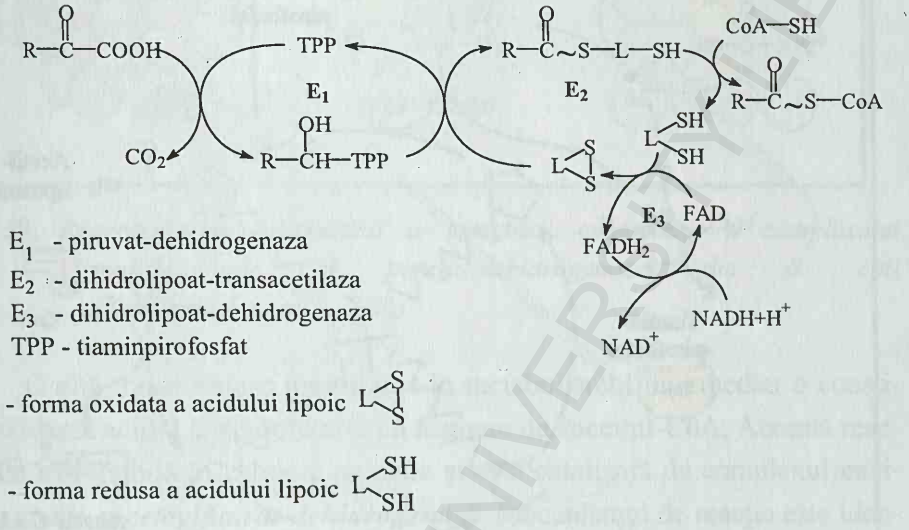


Fig. 37. Reprezentarea schematică a transformărilor ce au loc în procesul decarboxilării oxidative a α-cetoacizilor

Procesul este deosebit de complex, mecanismul decarboxilării piruvatului fiind identic cu cel întâlnit şi la ceilalţi α-cetoacizi (fig. 38).

Deosebit de intens a fost studiat complexul multiuenzimatic al piruvat-dehidrogenazei izolat din *E. coli*. S-a demonstrat că molecula sa este o proteină oligomeră alcătuită din 60 de subunităţi din care câte 24 de subunităţi ale enzimelor E_1 şi E_2 şi 12 subunităţi ale enzimei E_3 ce formează o arhitectură spaţială complexă (fig. 39).

BCU IAŞI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

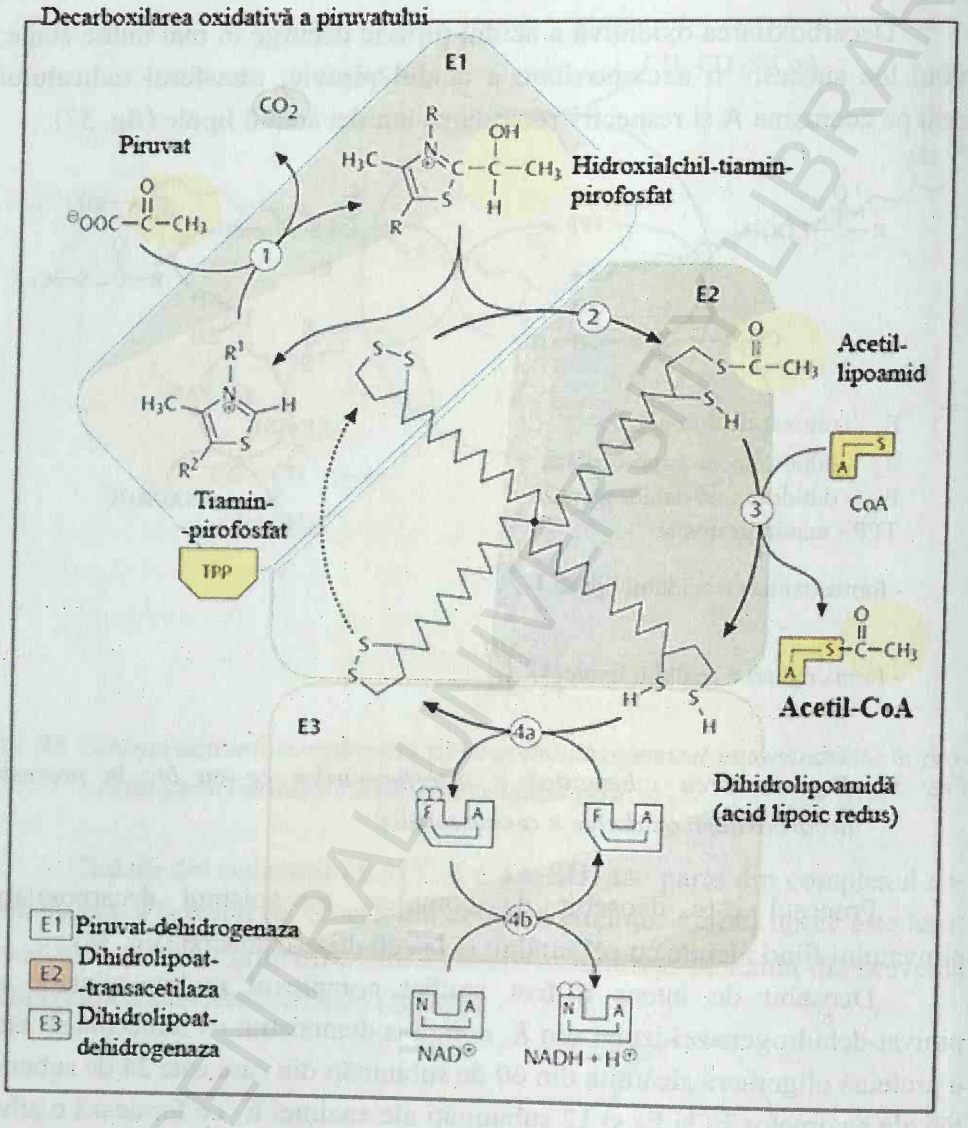


Fig. 38. Mecanismul de acțiune al complexului multienzimatic al piruvat-dehidrogenazei (Koolman, J. et al. – 2005)

BCU IAȘI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

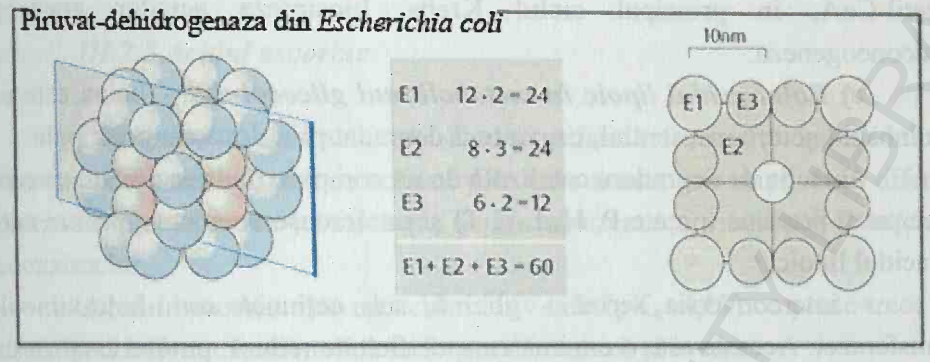


Fig. 39. Reprezentarea schematică a structurii cuaternare a complexului multienzimatic al piruvat-dehidrogenazei din E. coli (Koolman, J. et al. – 2005)

O altă transformare importantă în metabolismul intermediar o constituie oxidarea acidul α-cetoglutaric cu formare de succinil-CoA. Această reacție este ireversibilă în celulele animale și este catalizată de complexul enzimatic numit ***α-cetoglutarat-dehidrogenază***. Mecanismul de reacție este identic, fiind necesară prezența aceloraşi cofactori: TPP, CoA-SH, NAD^+, FAD şi acid lipoic. Din punct de vedere structural, acest complex multienzimatic este asemănător cu sistemul piruvat-dehidrogenazic.

b) ***Rolul acidului lipoic în gluconeogeneză.*** În afară de rolul de cofactor jucat în reacțiile de degradare oxidativă a α-cetoacizilor, acidul lipoic mai joaca un rol la fel de important în metabolismul glucidic. Studiul acestei funcții a fost declanşat atunci când s-a observat că o creştere a concentrației acidului lipoic determină o accelerare a consumului de glucoză. S-a mai observat că activarea glicolizei este cauzată de diminuarea cantității de acetil-CoA liberă. Această scădere a nivelului celular de acetil-CoA antrenează o scădere a concentrației citratului care, la rândul lui, conduce la o activare a fosfofructokinazei.

Pe de altă parte, biosinteza glucozei din şase substrate importante (piruvat, alanină, glicerină, dihidroxiacetonă, lactat şi fructoză) este inhibată de acidul lipoic, gradul de inhibiție fiind dependent de concentrația acestuia. Capacitatea acidului lipoic de a stoca acetil-CoA în mitocondrii sub formă complexă cu diminuarea corespunzătoare a concentrației acetil-CoA libere, determină o încetinire a tuturor secvențelor metabolice în care este implicată

acetil-CoA, în principal ciclul Krebs, biosinteza acizilor graşi şi gluconeogeneza.

c) ***Rolul acidul lipoic în metabolismul glicocolului.*** Glicina este un aminoacid neutru, neesential, ce poate fi degradat prin două căi principale:

- reacţia de degradare catalizată de un complex multienzimatic ce conţine patru proteine (notate P, H, L şi T) şi numeroase coenzime, printre care şi acidul lipoic;

- interconversia serină - glicină, sub acţiunea serin-hidroximetil-transferazei. Aceasta este o enzimă cu specificitate redusă, putând cataliza un număr relativ mare de transformări ale aminoacizilor şi necesită piridoxal-fosfatul în calitate de cofactor.

În prezenţa acidului lipoic, această enzimă mai poate cataliza şi o reacţie de decarboxilare, reacţie studiată *in vitro* prin utilizarea glicinei în calitate de substrat. În condiţiile experimentului, serin-hidroximetil-transferaza pare să mimeze rolul proteinei P din complexul multienzimatic specific clivării glicocolului şi se pare că ambele enzime conţin piridoxalfosfatul în calitate de cofactor. Pe de altă parte, ambele enzime necesită prezenţa acidului lipoic, fie în stare liberă (cum ar fi de exemplu în cazul pentru serin-hidroximetil-transferazei), fie în formă legată cu proteina H în reacţia catalizată de proteina P.

d) ***Rolul acidului lipoic în biosinteza prostaglandinelor.*** Se pare că acidul lipoic este un activator al biosintezei prostaglandinelor, în special al PGE, în prezenta unor concentraţii crescute ale acizilor graşi nesaturaţi cu catenă lungă. La concentraţii scăzute ale acestora, acţiunea acidului lipoic este inversă, de inhibare. Aceste efecte se realizează prin mecanisme încă neelucidate, asupra cărora există doar două ipoteze:

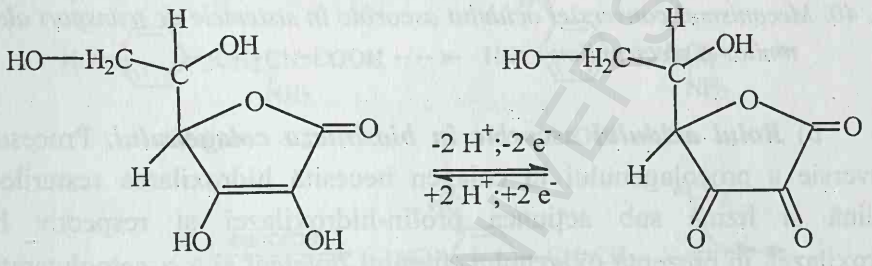
- o ipoteză a fost elaborată prin analogie cu puterea reducătoare a glutationului asupra endoperoxizilor G şi H, când acesta acţionează în calitate de coenzimă pentru endoperoxidiizomerază;

- a doua ipoteză presupune că acidul lipoic poate stimula consumul de oxigen modificând în felul acesta activitatea ciclooxigenazei prin modificarea parametrilor cinetici ai enzimei.

III.2.3 Acidul ascorbic

Din grupa coenzimelor de natură alifatică face parte şi acidul L-ascorbic, deşi mecanismul de acţiune prin care acesta este implicat în diferite procese metabolice nu justifică pe deplin apartenenţa vitaminei C la clasa coenzimelor.

Acidul ascorbic este un acid relativ tare (pK_a=4,17) ce poate trece cu uşurinţă din forma sa dienolică în forma dicetonică şi invers:



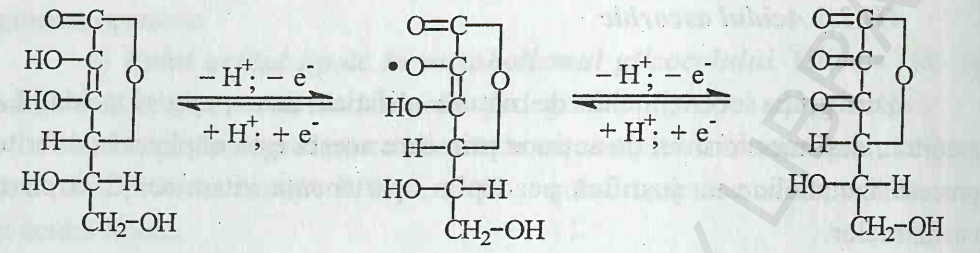
acid L-ascorbic acid L-dehidroascorbic

Potenţialul redox al acidul ascorbic are o valoare situată între cea a potenţialului piridinnucleotidelor şi a citocromului c, fiind de acelaşi ordin de mărime cu potenţialul redox al glutationului. Acest lucru a sugerat faptul că acidul ascorbic ar putea juca şi un rol de transportor de hidrogen la nivel celular.

În organismele vegetale, conversia acidului L-ascorbic în acid dehidroascorbic are loc sub acţiunea ***ascorbat-oxidazei***, în timp ce în organismele animale această oxidare este realizată de sistemul citocromic deoarece ascorbat-oxidaza nu este prezentă în ţesuturile animale. Reacţia inversă se realizează sub acţiunea glutation-dehidrogenazei.

Rolul biologic al acidul ascorbic constă, în primul rând, în cel de protecţie antioxidantă, datorită proprietăţilor sale reducătoare şi datorită capacităţii de a interacţiona uşor cu radicalii oxigenaţi liberi.

a) ***Rolul acidului ascorbic în transportul protonilor şi electronilor*** este asigurat de capacitatea acestuia de a trece reversibil din forma dienolică în cea dicetonică (fig. 40).



acid L-ascorbic | radical ascorbic liber | acid L-dehidroascorbic

Fig. 40. Mecanismul conversiei acidului ascorbic în sistemele de transport ale protonilor şi electronilor

b) ***Rolul acidului ascorbic în biosinteza colagenului.*** Procesul de conversie a procolagenului în colagen necesită hidroxilarea resturilor de prolină şi lizină sub acţiunea prolin-hidroxilazei şi respectiv lizin-hidroxilazei, în prezenţa oxigenului, fierului bivalent şi a α-cetoglutaratului. Rolul acidului ascorbic în aceste procese constă în împiedicarea oxidării grupelor tiolice din apoenzime. Dacă colagenul se formează în absenţa acidului ascorbic, fibrilele sale sunt mai puţin numeroase şi purtătoare de anomalii structurale, care explică tuberculozarea ţesuturilor conjunctive în scorbut.

c) ***Rolul acidului ascorbic în alte reacţii de hidroxilare.*** Acidul ascorbic mai este implicat în acţiunea unor hidroxilaze specifice ce catalizează etapele iniţiale ale metabolismului lipidelor şi steroizilor, precum şi al unor medicamente. De exemplu, hidroxilazele citocrom P_{450}-dependente din microsomi catalizează, în prezenţa acidului ascorbic, transformarea colesterolului în acizi biliari, precum şi hidroxilarea sau demetilarea substanţelor aromatice şi a altor xenobiotice cum ar fi unii poluanţi cancerigeni şi unele pesticide. Pe de altă parte, procesul de biosinteză a corticosteroizilor cuprinde şi o etapă de hidroxilare la nivel mitocondrial şi microsomal. În absenţa acidului ascorbic, această transformare decurge foarte lent, însă se restabileşte rapid după administrarea de ascorbat. O funcţie asemănătoare o prezintă acidul ascorbic prin implicarea sa în biosinteza catecolaminelor.

Astfel, conversia DOP-aminei în noradrenalină este catalizată de ***DOP – amin - hidroxilază (3,4 – dihidroxifenil – etilamin –ascorbat : oxigen – oxidoreductaza*** numită şi ***DOP-amin-β-monooxigenază*** (EC 1.14.17.1) care

necesită acid L-ascorbic, oxigen molecular şi ioni de cupru. Aşa se explică faptul că biosinteza catecolaminelor se realizează cu precădere în ţesuturile bogate în ascorbat (glandele suprarenale, creier etc.). Pe de altă parte, acidul ascorbic contribuie şi la conversia dihidrobiopterinei în tetrahidrobiopterină, aceasta din urma fiind necesară hidroxilării fenilalaninei şi tirozinei. Mai este posibilă, de asemenea, o acţiune de protecţie a catecolaminelor de către ascorbat, prin interacţiuni directe şi eliminarea adrenocromului, metabolit toxic al epinefrinei (fig. 41).

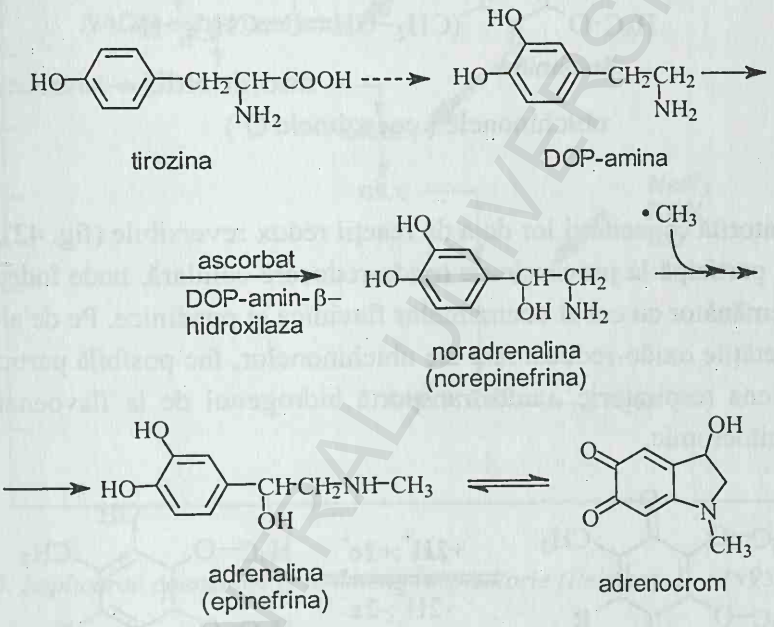


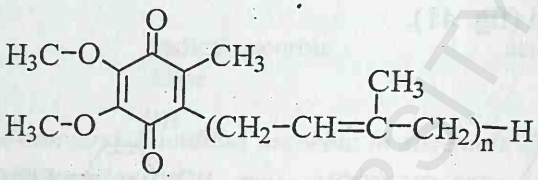
Fig. 41. Biosinteza catecolaminelor şi conversia lor în adrenocrom

Tirozina poate fi degradată cu formare de acid homogentizinic care se elimină pe cale renală. Ultima etapă a acestei secvenţe metabolice este catalizată de o oxidază specifică, ascorbat-dependentă.

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

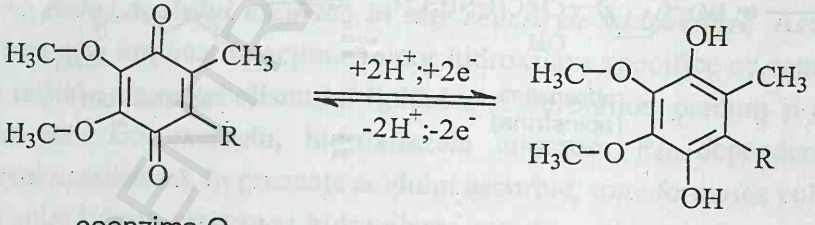
III.3 COENZIME DE NATURĂ AROMATICĂ

Din această clasă fac parte ubichinonele sau coenzimele Q, substanțe ce conțin în molecula lor un număr variabil de unități izoprenice şi un nucleu derivat de la hidrochinonă:



ubichinonele (coenzimele Q)

Datorită capacității lor de a da reacții redox reversibile (fig. 42), coenzimele Q participă la procesele de oxido-reducere celulară, unde îndeplinesc un rol asemănător cu cel al coenzimelor flavinice şi piridinice. Pe de altă parte, proprietățile oxido-reducătoare ale ubichinonelor, fac posibilă participarea lor în catena respiratorie, unde transportă hidrogenul de la flavoenzime la sistemul citocromic.



coenzima Q (forma oxidată)

coenzima Q (forma redusă)

Fig. 42. Participarea ubichinonelor în reacții redox

În celulele animale, ubichinonele sunt prezente predominant în mitocondrii, în special sub forma compusului cu 10 unități izoprenoide (***ubichinona 10***), însă numărul acestora poate oscila între 4 si 12. Din această cauză, reprezentanții respectivi ai coenzimei Q sunt denumiți ***ubichinona 6***,

ubichinona 8 etc. În celulele vegetale se întâlneşte în plastide o ubichinonă specială numită ***coenzima Q_{245}*** (absorbţie maximă la 245 nm) sau ***plastochinona*** care conţine 9 unităţi izoprenoidice, iar grupările metoxi din poziţiile 4 şi 5 ale nucleului naftochinonic sunt înlocuite cu grupe metil.

Cea mai importantă funcţie biochimică a coenzimei Q o constituie implicarea sa în catena respiratorie, proces în care se realizează transferul de electroni de la metaboliţi cu potenţial negativ mare la oxigen (fig. 43).

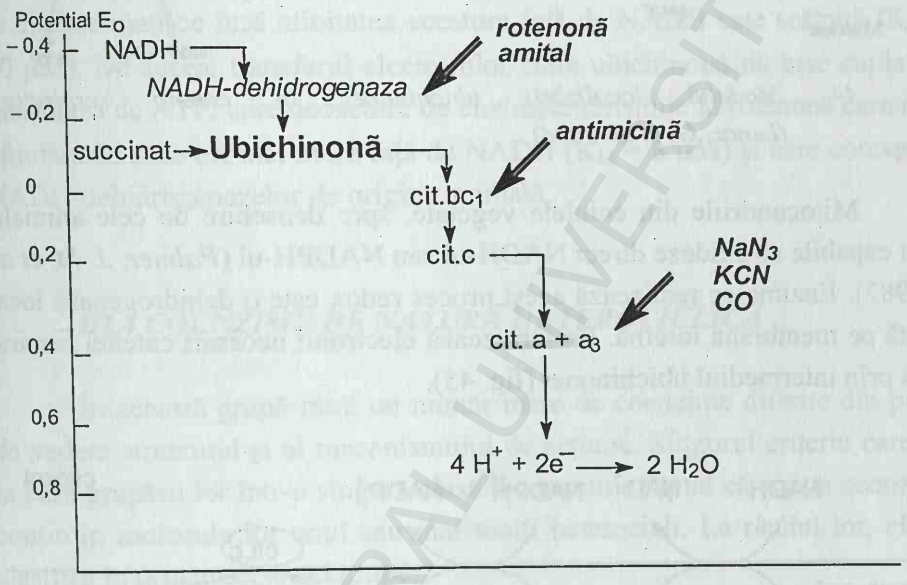


Fig. 43. Implicarea coenzimei Q în catena respiratorie (Pelmont, J. – 1995)

Componentele căii respiratorii sunt enzime membranare grupate în complecşii I, II şi IV şi realizează transportul de electroni de la NADH la oxigen. Joncţiunea între aceşti complecşi este realizată de către ubichinonă (CoQ) şi citocromul c (fig. 44).

Complexul IV, care este ***citocrom-oxidaza*** (***citocrom a + a_3***) cedează electronii oxigenului molecular deoarece reducerea până la două molecule de apă necesită patru electroni şi patru protoni.

Transferul electronilor de la NADH la coenzima Q are loc sub acţiunea enzimei numită ***ubichinon-reductază*** sau ***NADH - dehidrogenază*** (***NADH : ubichinonă - oxidoreductaza***, EC 1.6.5.3) care este o enzimă cu fier şi sulf FMN-dependentă.

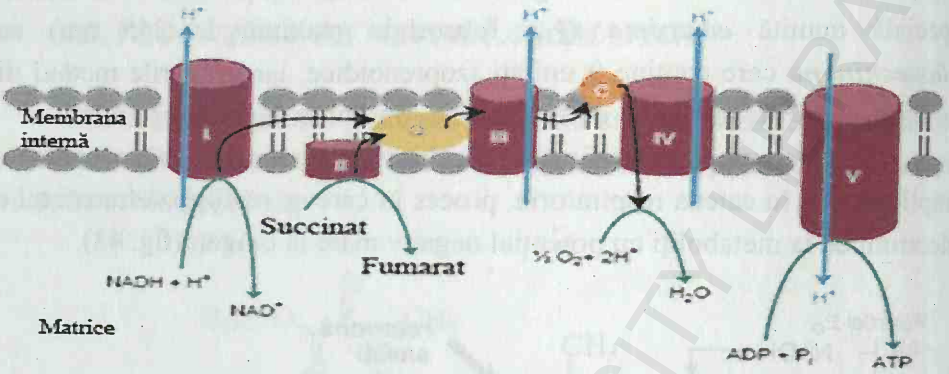


Fig. 44. Modelul localizării ubichinonei în catena respiratorie (Lenaz, G. et al. 2004)

Mitocondriile din celulele vegetale, spre deosebire de cele animale, sunt capabile să oxideze direct NADH-ul sau NADPH-ul (*Palmer, J. M. et al.* – 1982). Enzima ce realizează acest proces redox este o dehidrogenază localizată pe membrana internă. Ea furnizează electronii necesari catenei respiratorii prin intermediul ubichinonei (fig. 45).

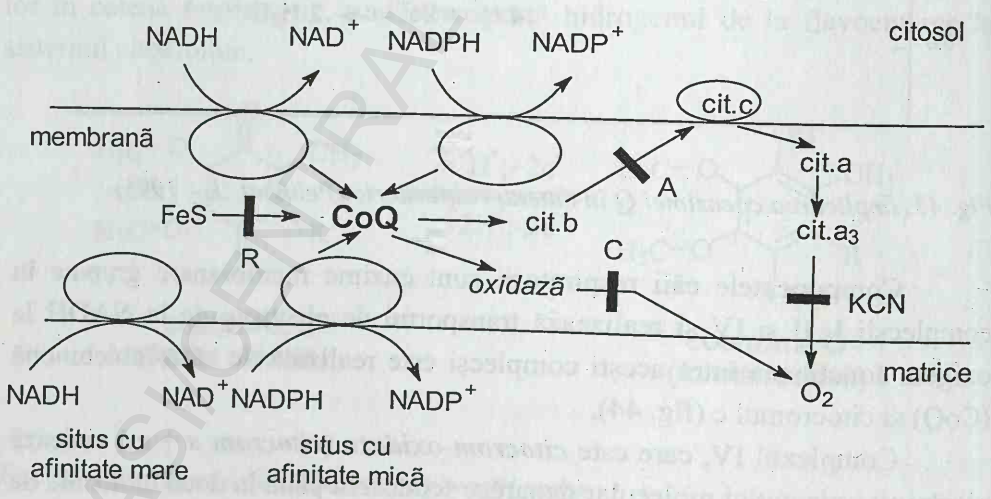


Fig. 45. Reprezentarea schematică a rolului ubichinonei în catena respiratorie A – antimicină; C – CLAM (m-clor-benzhidroxamat); R – rotenonă (Palmer, J.M. et al. - 1982).

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

În afară de aceasta, mitocondriile vegetale mai conţin şi un transportor de NAD^+ ceea ce le deosebeşte net de mitocondriile animale (*Douce, R.* – 1985). Procesul redox reprezentat schematic în figura 45 constă în cuplarea NADH-ului cu lanţul respirator prin intermediul coenzimei Q şi acţiunea a cel puţin trei NADH – dehidrogenaze care sunt flavoproteine cu o structură relativ complexă.

Centrii activi ai NADH-dehidrogenazelor din mitocondriile vegetale sunt rezistente la acţiunea rotenonei. În cazul enzimelor localizate la suprafaţa dinspre matrice însă afinitatea acestora faţă de NADH este scăzută (K_M = 80 μM). De aceea, transferul electronilor către ubichinonă nu este cuplat cu biosinteza de ATP, spre deosebire de enzimele sensibile la rotenonă care au o afinitate de zece ori mai mare faţă de NADH (K_M = 8 μM) şi care corespund NADH-dehidrogenazelor de origine animală.

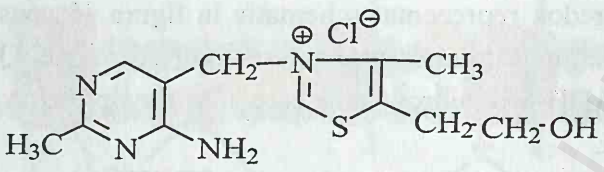
III.4 COENZIME DE NATURĂ HETEROCICLICĂ

În această grupă intră un număr mare de coenzime diferite din punct de vedere structural şi al mecanismului de acţiune. Singurul criteriu care stă la baza grupării lor într-o singură clasă îl constituie faptul că aceste coenzime conţin în molecula lor unul sau mai mulţi heterocicli. La rândul lor, ele se clasifică în următoarele subgrupe:

- coenzime derivate de la tiamină;
- coenzime derivate de la biotină;
- coenzime derivate de la piridoxină;
- coenzime derivate de la acid folic;

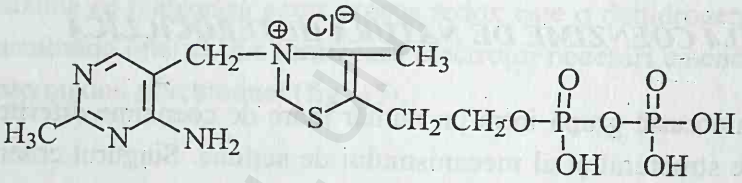
III.4.1 Coenzime derivate de la tiamină

Ca toate celelalte vitamine hidrosolubile cunoscute, tiamina (aneurina, vitamina B_1) îndeplineşte şi o funcţie coenzimatică în celula vie. Tiamina este una din primele vitamine studiate sub aspectul importanţei sale în nutriţie şi al structurii chimice. Din punct de vedere structural, tiamina este 3-(4'-amino-2'-metil-5'-pirimidinil-metil)-5-(β-hidroxietil)-4-metil-tiazol:



clorhidrat de tiaminã

Sub forma sa liberă, tiamina îndeplineşte rol vitaminic. Rolul de coenzimă este îndeplinit de forma sa pirofosforilată, când gruparea alcoolică primară a restului hidroxietil legat de heterociclul tiazolic este esterificată cu pirofosfat, cu formare de tiaminpirofosfat, numit şi cocarboxilază sau difosfotiamină:



tiaminpirofosfat (TPP)
(cocarboxilazã)

Principala funcţie biologică a aneurinei o constituie cea de coenzimă, sub formă de tiaminpirofosfat, pentru enzimele participante la decarboxilarea oxidativă a piruvatului, α-cetoglutaratului şi a α-cetoacizilor rezultaţi în urma transaminării aminoacizilor alifatici cu catenă ramificată. TPP este, de asemenea, coenzimă pentru transcetolază, enzimă cheie a ciclului pentozofosfatilor sau a căii fosfogluconatului. Derivaţii tiaminei nu se leagă covalent de apoenzimele lor, deşi sunt strâns ataşate de acestea. Faptul că TPP poate fi disociat de diferite apoenzime, face posibilă o competiţie între diferite enzime pentru cocarboxilază, precum şi o eventuală modificare a activităţii catalitice determinată de creşterea concentraţiei TPP sau a precursorilor săi.

a) **Rolul tiaminei în decarboxilarea α-cetoacizilor.**

Decarboxilarea oxidativă a α-cetoacizilor are loc sub acțiunea unor complecși multienzimatici în structura cărora intră mai mulți cofactori. Astfel, reacția de decarboxilare oxidativă a acidului piruvic cu formare de acetil-CoA se realizează sub acțiunea complexului enzimatic numit ***piruvat-dehidrogenază*** care este format din trei enzime ***(piruvat - dehidrogenaza, dihidrolipoat - transacetilaza*** și respectiv ***lipoamid - dehidrogenaza***) și cinci coenzime (TPP, acid lipoic, CoA-SH, NAD^+ și FAD) (vezi cap.III.2.2).

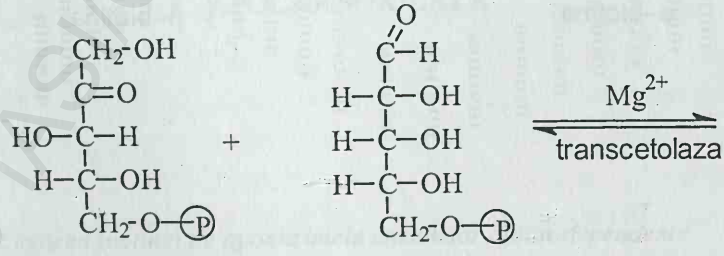
b) **Rolul tiaminei în reacțiile de transacetilare**

Cocarboxilaza mai participă și la alte etape ale catabolismului glucidic jucând rol de coenzimă pentru transcetolază. Această enzimă este localizată în citosol și se întâlnește preponderent în ficat, inimă, rinichi, intestin, creier, hematii etc.

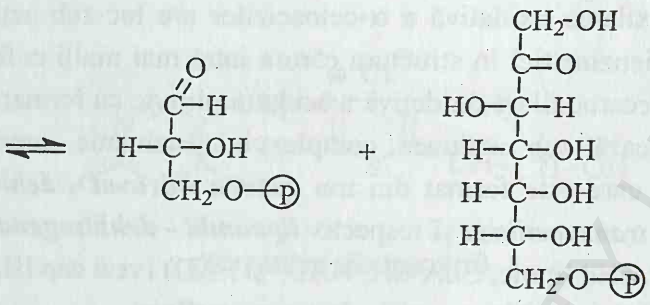
Reacția are loc în etape, iar în prima fază se realizează cuplarea TPP cu apotranscetolaza inactivă în vederea formării complexului enzimatic activ. Atunci când nivelul TPP este scăzut, se observă o diminuare considerabilă a activității transcetolazice. Același fenomen se observă și la bolnavii cu sindrom Korsakoff la care afinitatea apotranscetolazei pentru coenzima sa este scăzută.

Transcetolaza (EC 2.2.1.1) catalizează reacția reversibilă de transfer a unui fragment ce conține doi atomi de carbon terminali din molecula fructozo-6-fosfatului pe scheletul hidrocarbonat al gliceraldehid-3-fosfatului.

Un exemplu concret întâlnit în metabolismul glucidic îl reprezintă conversia ribozo-5-fosfatului și xilulozo-5-fosfatului, sub acțiunea transcetolazei, în sedoheptulozo-7-fosfat și gliceraldehid-3-fosfat, această transformare facând parte din calea pentozofosfatilor (calea Warburg-Dickens-Horecker):



xilulozo-5-fosfat ribozo-5-fosfat

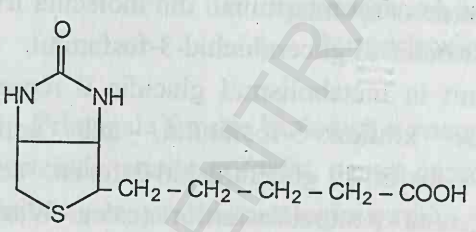


aldehida 3-fosfoglicericã

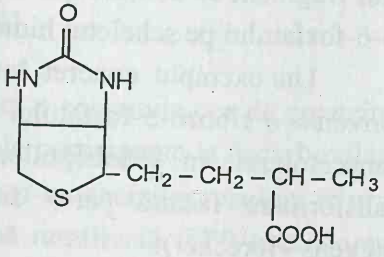
sedoheptulozo-7-fosfat

III.4.2 Coenzime derivate de la biotină

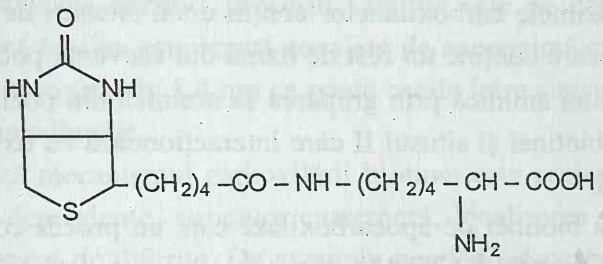
Biotina a fost descoperită în 1941 de către *Kögl* care arată că ea reprezintă unul din constituenții așa-numitului factor ***Bios II*** izolat din gălbenușul de ou și că reprezintă un factor de creștere pentru drojdia de bere. Câțiva ani mai târziu, *West* și *Wilson* descoperă coenzima R cu rol în stimularea creșterii la *Rhizobium trifolii*, care s-a dovedit a fi biotina identificată de Kögl. Din punct de vedere structural, biotina poate exista sub trei forme: α-biotină, β-biotină și biocitină:



α–biotina



β–biotina



biocitina

Principala funcție biochimică a biotinei constă în rolul ei de coenzimă pentru carboxilaze, enzime ce catalizează incorporarea CO_2 în diferite substanțe cu formarea unor metaboliți intermediari importanți. În acest scop, biotina trebuie să interacționeze cu apoenzimele carboxilazelor, activarea acesteia și fixarea pe apoenzimă reprezentând două etape importante ale metabolismului coenzimei R. Modul de legare al biotinei de apoenzime este identic pentru toate carboxilazele biotin-dependente (fig. 46), fiind vorba de o legătură covalentă de tip amidic formată de gruparea –COOH a biotinei și o grupa ε-amino a unui rest de lizină din secvențele polipeptidice ale apocarboxilazelor.

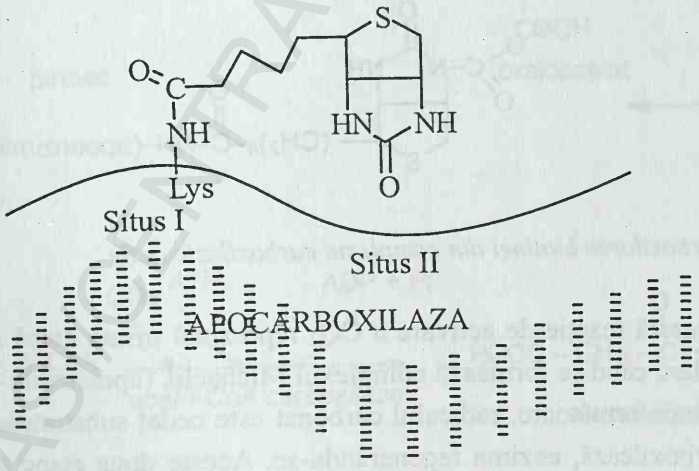


Fig. 46. Legarea biotinei de apoenzimele enzimelor biotin-dependente

Apoenzimele carboxilazelor conțin două situsuri de legare a coenzimei: situsul I care conține un rest de lizină din secvența polipeptidică ce formează o legătură amidică prin gruparea sa aminică din poziția ε cu gruparea carboxilică a biotinei și situsul II care interacționează cu oxigenul carbonilic al cofactorului.

Fixarea biotinei pe apocarboxilaze este un proces complex, catalizat de o sintetază specifică ATP-Mg-dependentă care există atât în mitocondrii (pentru carboxilazele mitocondriale) cât și în citosol (pentru acetil-CoA-carboxilază). Toate reacțiile de carboxilare sunt precedate de activarea CO_2 prin fixarea sa pe biotină (fig. 47). Reacția de carboxilare a biotinei se face atât cu dioxidul de carbon liber cât, mai ales, cu anionii bicarbonat, în prezența ionilor de magneziu și cu ajutorul energiei din moleculele de ATP, cu formare de carboxi-biotină.

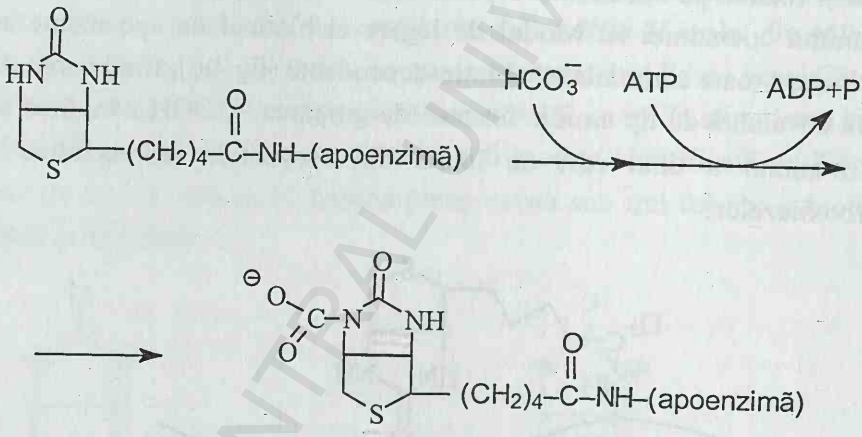


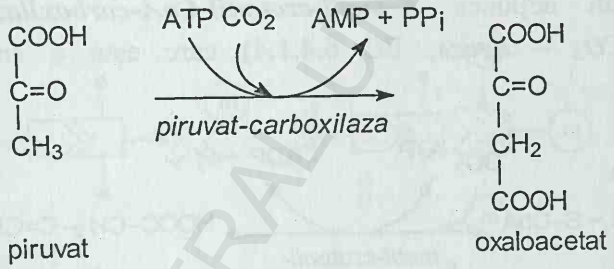
Fig. 47. Carboxilarea biotinei din complexul carboxilazic activ

Această reacție de activare a CO_2 reprezintă prima etapă a reacțiilor de carboxilare când se formează complexul Michaelis (apoenzimă – biotină – CO_2). În etapa următoare, radicalul carbonat este cedat substratului acceptor care se carboxilează, enzima regenerându-se. Aceste doua etape ale reacției de carboxilare se realizează în situsuri diferite ale enzimei. Etapa de carboxilare a cofactorului cu formare de carboxibiotină se realizează în ***„situsul carboxilazic"*** al enzimei, iar transferul grupei carboxil la substratul acceptor are loc în ***„situsul transferazic"***. Deși este vorba de situsuri cataliti-

ce diferite ale aceleiaşi enzime, procesul catalitic este pe deplin realizabil datorită faptului că biotina este legată covalent de apoenzimă sub forma unui *„braţ"* mobil de aproximativ 1,4 nm ce poate oscila între situsul carboxilazic şi cel carboxil-transferazic.

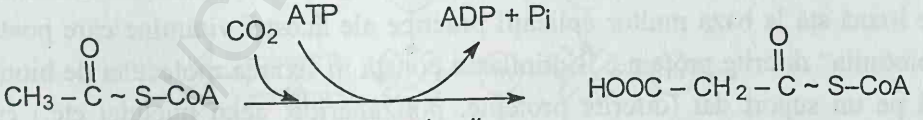
Chiar dacă mecanismul carboxilării biotinei este acelaşi pentru toate enzimele biotin-dependente, structura cuaternară, localizarea şi modulatorii acestora sunt extrem de diferite. De exemplu ***acetil-CoA-carboxilaza (acetil – CoA: CO_2 – ligaza ADP formatoare,*** EC 6.4.1.2) este o enzimă citoplasmatică în timp ce alte carboxilaze sunt localizate în mitocondrii.

Deseori, carboxilazele sunt enzime cheie pentru anumite secvenţe metabolice. De exemplu, ***piruvat-carboxilaza*** (EC 6.4.1.1) catalizează conversia piruvatului în oxalo-acetat, această reacţie reprezentând prima etapă a gluconeogenezei. În mod similar ***acetil-CoA-carboxilaza*** (EC 6.4.1.2) catalizează prima reacţie a căii de biosinteză a acizilor graşi când are loc carboxilarea acetil-CoA cu formare de malonil-CoA.



piruvat oxaloacetat

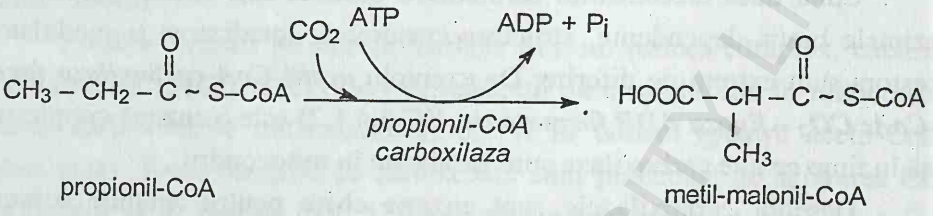
şi respectiv:



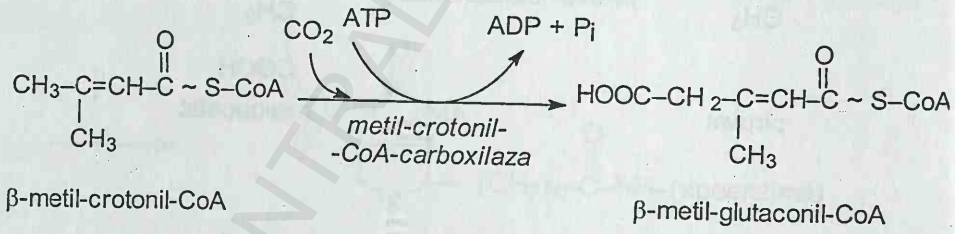
acetil–CoA malonil–CoA

Propionil-CoA-carboxilaza (EC 6.4.1.3) este o altă enzimă biotin-dependentă ce catalizează transformarea propionil-CoA în metil-malonil-CoA utilizând în calitate de precursori primari treonina, metionona, valina, izoleucina precum şi acizii graşi cu număr impar de atomi de carbon. În urma

acțiunii unor mutaze specifice, are loc o reacție de izomerizare prin care metil-malonil-CoA trece în succinil-CoA, aceasta din urmă intrând apoi în ciclul acizilor tricarboxilici:

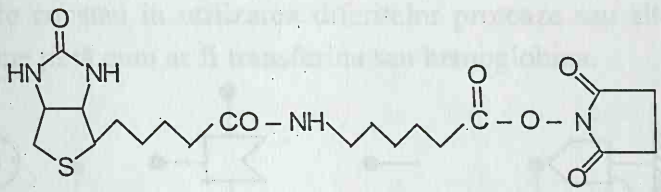


Este cunoscut faptul că acidul izovalerianic este degradat în organismele animale până la acetil-CoA şi acid acetilacetic. La rândul lui, acidul izovalerianic este un produs intermediar al metabolismului leucinei. Sub acțiunea unor dehidrogenaze specifice, izovaleril-CoA trece în β-metil-crotonil-CoA. La acest nivel are loc mărirea catenei atomilor de carbon prin carboxilare sub acțiunea ***β–metil-crotonil-CoA-carboxilazei (β-metil-crotonil-CoA:CO_2 – ligaza,*** EC 6.4.1.4) care este o enzimă biotin-dependentă:

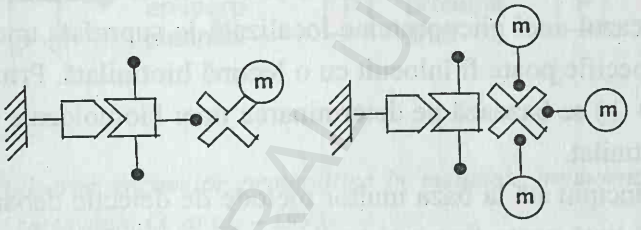


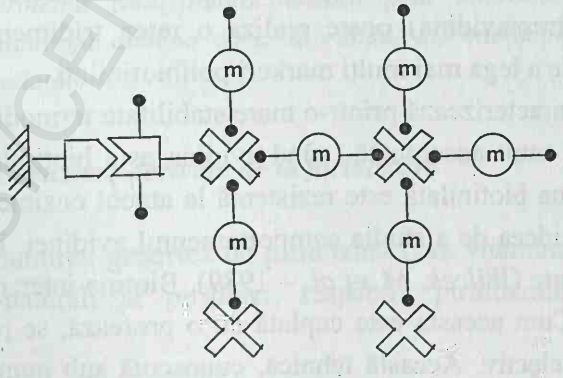
Capacitatea biotinei de a interacționa cu grupele ε-amino ale resturilor de lizină stă la baza multor aplicații practice ale acestei vitamine care poate "biotinila" diferite proteine. Biotinilarea constă în fixarea moleculei de biotină pe un suport dat (diferite proteine, polizaharide, acizi nucleici etc.) cu formarea unui braț ce conferă o mare flexibilitate restului de biotină. În practică se utilizează des esterii N-hidroxi-succinimidei cu catenă mare:

BCU "IOAN CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY



Aceasta înseamnă că biotina poate fi folosită la marcarea anumitor macromolecule de importanță practică utilizând un reactiv special. Această vitamină prezintă o proprietate extrem de importantă şi anume capacitatea sa de a interacționa în mod specific cu ***avidina*** (o proteină din albuşul de ou) sau cu ***streptavidina*** (produsă de *Streptomyces avidinii*). Această proprietate este exploatată în diferite metode imunoenzimatice de analiză. În practică, streptavidina se foloseşte mai frecvent decât avidina, nefiind o proteină glicozilată, ceea ce conduce la diminuarea drastică a efectelor secundare. În principiu, biotinilarea proteinelor poate servi la fixarea oricăror markeri. În aceste metode, avidina (streptavidina) joacă rol de ligand specific (fig. 48).





BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITARĂ LIBRARY

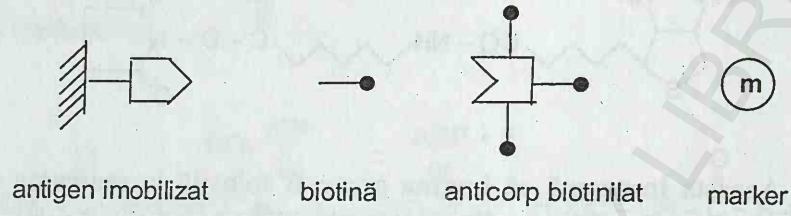


Fig. 48. Principiul metodelor de marcare a diferiților metaboliți cu ajutorul biotinei (Livnah, O. at al. – 1993)

Plecând de la capacitatea avidinei (streptavidinei) de a interacționa specific cu biotina, au fost puse la punct mai multe metode de marcare a biomoleculelor.

Toate aceste metode se bazează pe principiile reprezentate schematic în figura 49. În primul caz (a), avidina marcată cu o sondă (marker) **m**, care este cel mai adesea o enzimă, detectează o biomoleculă recunoscută de către un anticorp. În cazul unei glicoproteine localizată la suprafața unei membrane, anticorpul specific poate fi înlocuit cu o lectină biotinilată. Principiul descris în figura 49 (b) se bazează pe determinarea unei biomolecule cu ajutorul unui marker biotinilat.

Acest principiu stă la baza multor metode de detecție deoarece una și aceiași moleculă țintă poate fixa mai multe sonde (markeri) ceea ce conduce la o amplificare puternică a gradului de marcare, deci și a semnalului de detecție. Gradul de amplificare este și mai mare în cazul descris în figura 49 c când avidina (streptavidina) poate realiza o rețea tridimensională datorită capacității sale de a lega mai mulți markeri polibiotinilați.

Avidina se caracterizează printr-o mare stabilitate termodinamică, această proprietate fiind mult accentuată când avidina este biotinilată. Aceasta înseamnă că avidina biotinilată este rezistentă la atacul enzimelor proteolitice. De aici a plecat ideea de a studia comportamentul avidinei în prezența unei proteaze biotinilate (*Wilcek, M. et al.* – 1989). Biotina interacționează specific cu avidina. Cum aceasta este cuplată cu o protează, se poate realiza un atac enzimatic selectiv. Această tehnică, cunoscută sub numele de ***cataliză țintă*** (*targeted catalysis*) a fost pusă la punct de către *Bayer, E.A.* și colab. la Institutul Weizmann din Rehovoth. Acest principiu stă la baza mai multor

metode care constau în utilizarea diferitelor proteaze sau altor enzime şi a unor proteine ţintă cum ar fi transferina sau hemoglobina.

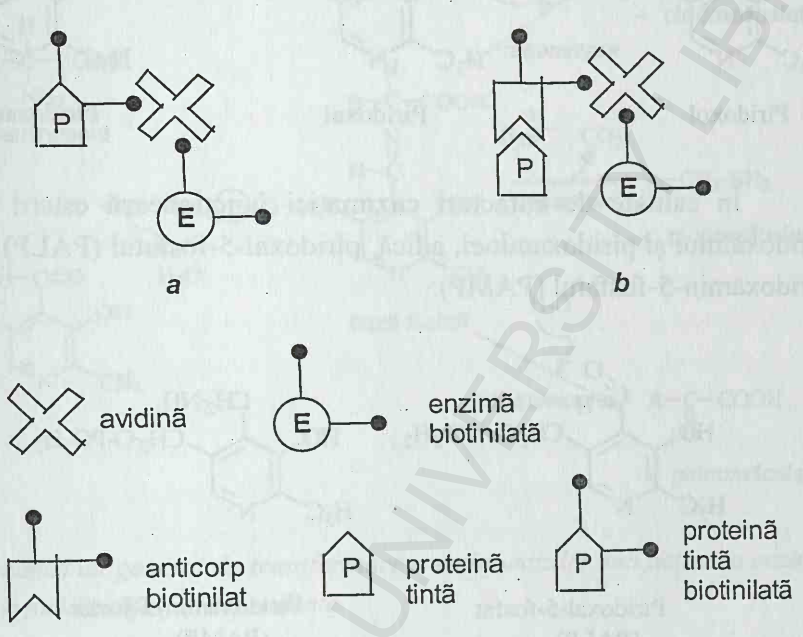


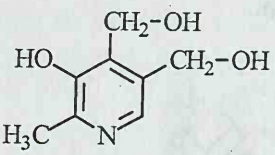
Fig. 49. Utilizarea enzimelor proteolitice în metodele imunoenzimatice de analiză(Livnah, O. at al. – 1993)

a) enzima interacţionează cu proteina ţintă biotinilată prin intermediul avidinei

b) proteina ţintă interacţionează prin intermediul unui anticorp biotinilat cu avidina care, la rândul ei, interacţionează cu enzima biotinilată

III.4.3 Coenzime derivate de la piridoxină

Sub denumirea generică de piridoxină (sau vitamina B_6) sunt reuniţi toţi derivaţii naturali ai piridinei, respectiv piridoxolul, piridoxalul şi piridoxamina:

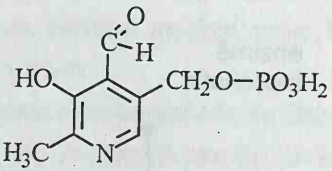


Piridoxol

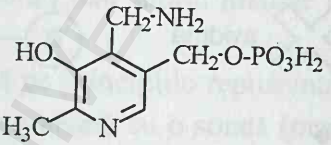
Piridoxal

Piridoxamina

În calitate de cofactori enzimatici funcționează esterii fosforici ai piridoxalului şi piridoxaminei, adică, piridoxal-5-fosfatul (PALP) şi respectiv piridoxamin-5-fosfatul (PAMP):



Piridoxal-5-fosfat
(PALP)



Piridoxamin-5-fosfat
(PAMP)

Conversia vitaminei B_6 în formele coenzimatice prin fosforilare se realizează sub acțiunea unei enzime specifice, ***piridoxal-kinaza***, prezentă în toate celulele vii. Această conversie are loc în etape, putîndu-se realiza în două moduri diferite:

a) conversia piridoxaminei în piridoxal sub *acțiunea* ***piridoxin-oxidazei*** urmată de o fosforilare a acestuia în prezența ***piridoxal-kinazei;***

b) transformarea piridoxolului în fosfat de piridoxol urmată de oxidarea acestuia în prezența unei enzime specifice, ***piridoxol-fosfat-oxidaza*** (EC 1.4.3.5).

Principala funcție biologică a piridoxinei o reprezintă rolul de coenzimă pentru unele enzime implicate în transformările neoxidative ale aminoacizilor: transaminare, decarboxilare, racemizare, α,β-eliminare etc.

Aceste transformări sunt posibile datorită capacității piridoxal-5-fosfatului de a forma cu uşurință complecşi ES sub forma unor baze Schiff între aminoacizi şi coenzimă (fig. 50). În felul acesta, aminoacidul este activat în vederea realizării transformărilor enzimatice ulterioare.

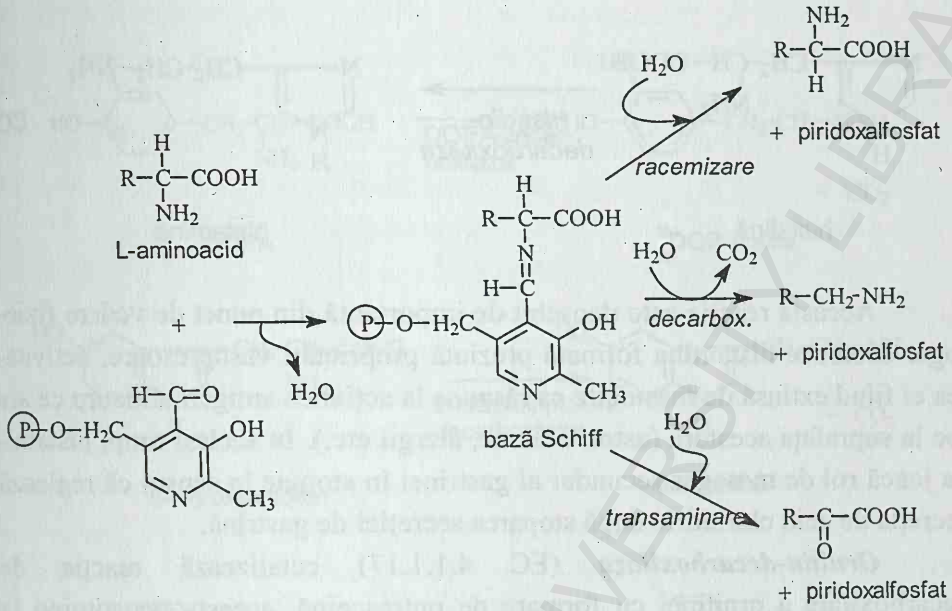


Fig. 50. Mecanismul general de transformare a aminoacizilor sub acțiunea enzimelor piridoxalfosfat-dependente

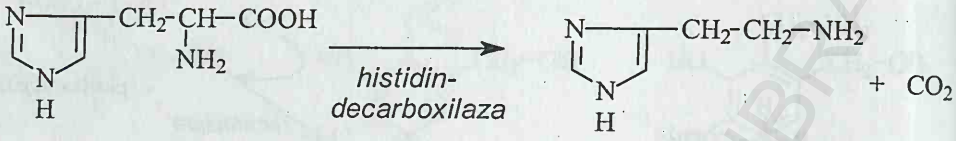
Principalele procese în care intervin enzimele piridoxalfosfat-dependente sunt: transaminarea, decarboxilarea, deshidratarea şi racemizarea aminoacizilor.

a) Decarboxilarea aminoacizilor

Una din căile generale de degradare a aminoacizilor este decarboxilarea acestora sub acțiunea unor enzime specifice piridoxalfosfat-dependente cu formarea aminelor corespunzătoare. În acelaşi timp, decarboxilarea aminoacizilor reprezintă o cale de biosinteza a unor compuşi biologic activi: aminele biogene şi unii hormoni tisulari (adrenalina, noradrenalina, serotonina, histamina etc.). Procesele de decarboxilare au loc sub acțiunea aminoacid-decarboxilazelor specifice, piridoxalfosfat-dependente.

Histidin-decarboxilaza (EC 4.1.1.22) catalizează decarboxilarea histidinei cu formare de histamină:

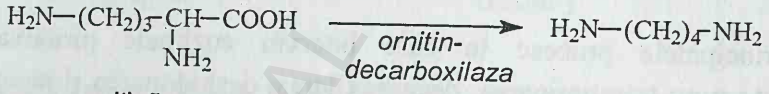
BCU CLUJ-NAPOCA UNIVERSITY LIBRARY



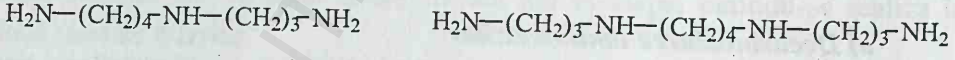
histidină histaminã

Aceasta reacție este deosebit de importantă din punct de vedere fiziologic deoarece histamina formată prezintă proprietăți vasopresoare, activitatea ei fiind extinsă de mastocite ca răspuns la acțiunea antigen-anticorp ce are loc la suprafața acestora (astm, eczeme, alergii etc.). În același timp, histamina joacă rol de mesager secundar al gastrinei în stomac în sensul că reglează secreția de acid clorhidric după stoparea secreției de gastrină.

Ornitin-decarboxilaza (EC 4.1.1.17) catalizează reacția de decarboxilare a ornitinei cu formare de putresceină, aceasta constituind la rândul ei precursorul a două poliamine esențiale pentru reglarea celulară și pentru interacțiunile dintre acizii nucleici și anume spermina și spermidina:



ornitinã putresceinã

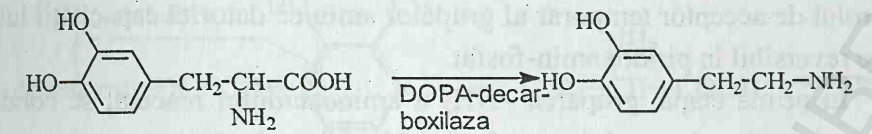


spermidinã sperminã

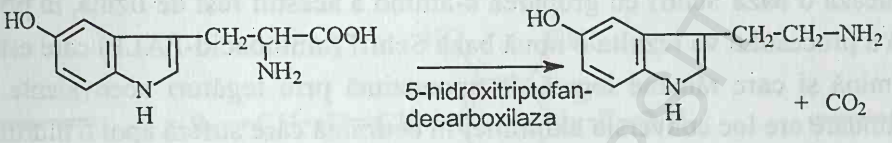
Se presupune că aceste poliamine mai pot juca rol de factori de creștere pentru unele microorganisme, factori de stabilizare a structurilor membranare și menținerea structurii secundare a ribozomilor.

Decarboxilazele aminoacizilor aromatici catalizează conversia dihidroxifenilalaninei (DOPA) în DOP-amină, 5-hidroxitriptofanului în 5-hidroxitriptamină (serotonină) și respectiv a tirozinei în tiramină:

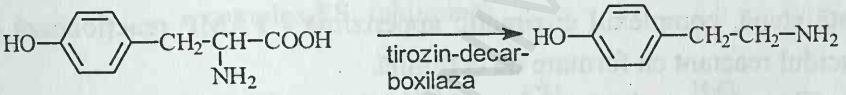
BCU "LUCIAN BLAGA" CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY



DOPA DOP-amina

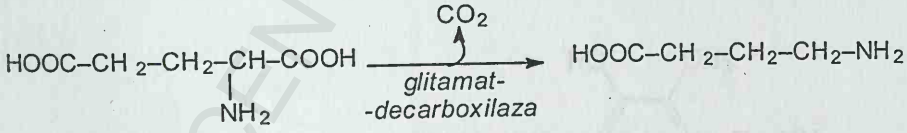


5-hidroxitriptofan serotonină



tirozină tiramină

În mod similar, **glutamat-decarboxilaza**, participă la decarboxilarea acidului glutamic cu formare de acid γ-aminobutiric, produsul de reacție fiind, de asemenea, un mediator chimic important.



glutamat GABA

b) Transaminarea aminoacizilor

O altă cale generală de degradare a aminoacizilor o constituie reacțiile de transaminare, catalizate de aminotransferaze specifice ce conțin piridoxalfosfatul în calitate de coenzimă. Reacția este reversibilă, acceptorul grupelor $-NH_2$ fiind un α-cetoacid care se transformă într-un α-aminoacid.

Reacțiile de transaminare au loc în două etape, piridoxalfosfatul jucând rolul de acceptor temporar al grupelor aminice datorită capacității lui de a trece reversibil în piridoxamin-fosfat.

În prima etapă, gruparea $-NH_2$ a aminoacidului reactant se condensează cu coenzima la nivelul grupei sale aldehidice, deplasând grupa ε-amino a restului de lizină din centrul activ al enzimei (fig. 51).

Cum în absența substratului grupa aldehidică a piridoxal-fosfatului formează o baza Schiff cu gruparea ε-amino a acestui rest de lizină, în prima fază a procesului va rezulta o nouă bază Schiff (aminoacid-PALP) care este o aldimină și care rămâne legată de apoenzimă prin legături necovalente. În continuare are loc conversia aldiminei în cetimină care suferă apoi o hidroliză în urma căreia se formează piridoxamin-fosfatul (PAMP) și noul α-cetoacid.

În etapa a doua a reacției de transaminare are loc formarea noului aminoacid și regenerarea enzimei în forma apoenzimă-PALP (fig. 52). În această etapă, complexul enzimatic apoenzimă - PAMP reacționează cu α-cetoacidul reactant cu formare de cetimină.

Cetimina rezultată trece apoi în aldimină, iar aceasta din urmă suferă o reacție de hidroliză cu formarea noului α-aminoacid și regenerarea enzimei în forma sa activă (apoenzimă - PALP) ce poate relua un nou ciclu de transformări. Succesiunea transformărilor din etapa a II-a a transaminării este inversă succesiunii reacțiilor din prima fază.

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

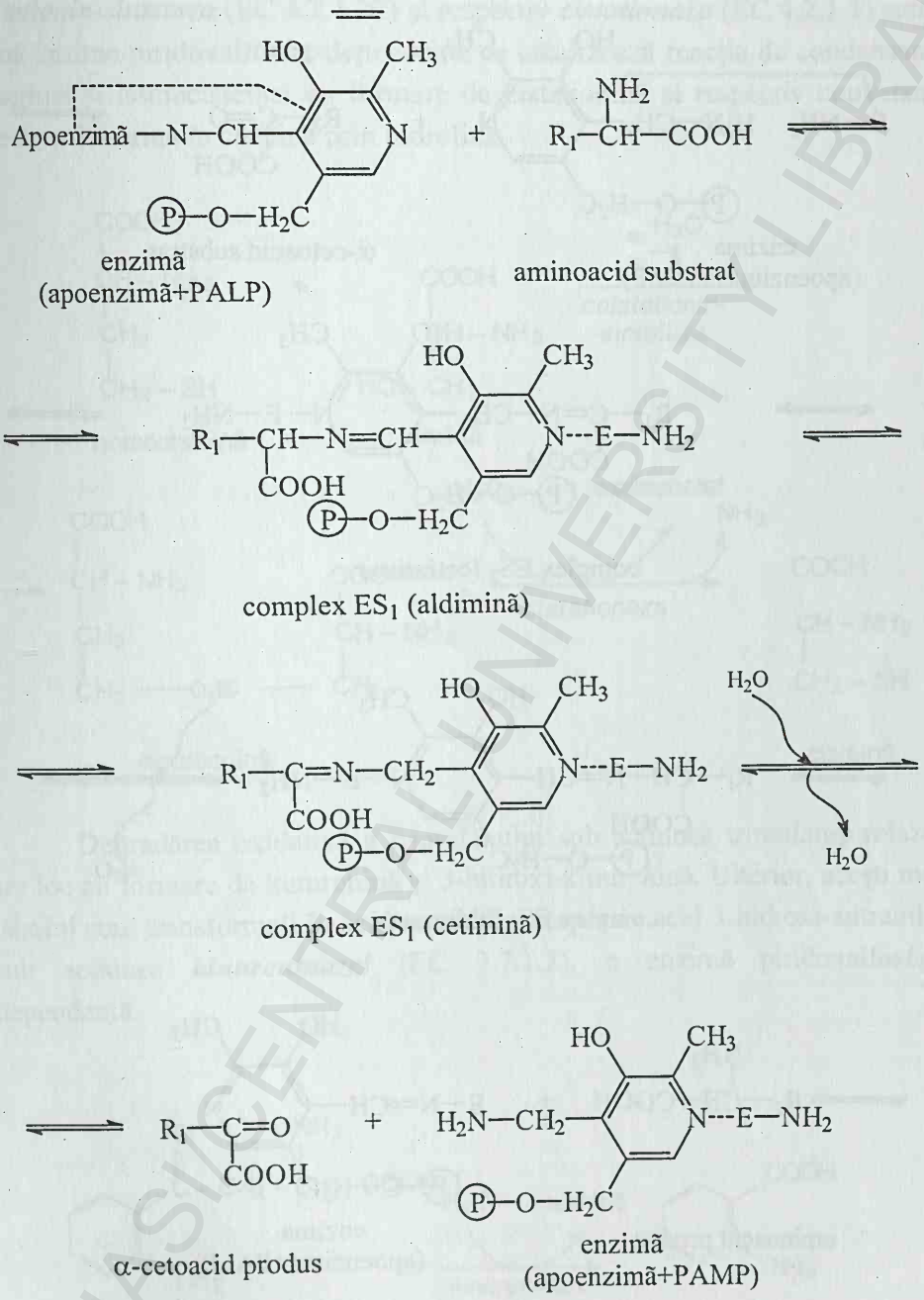


Fig. 51. Mecanismul reacţiei de transaminare. Formarea cetoacidului

BCU IASI CENTRALA UNIVERSITY LIBRARY

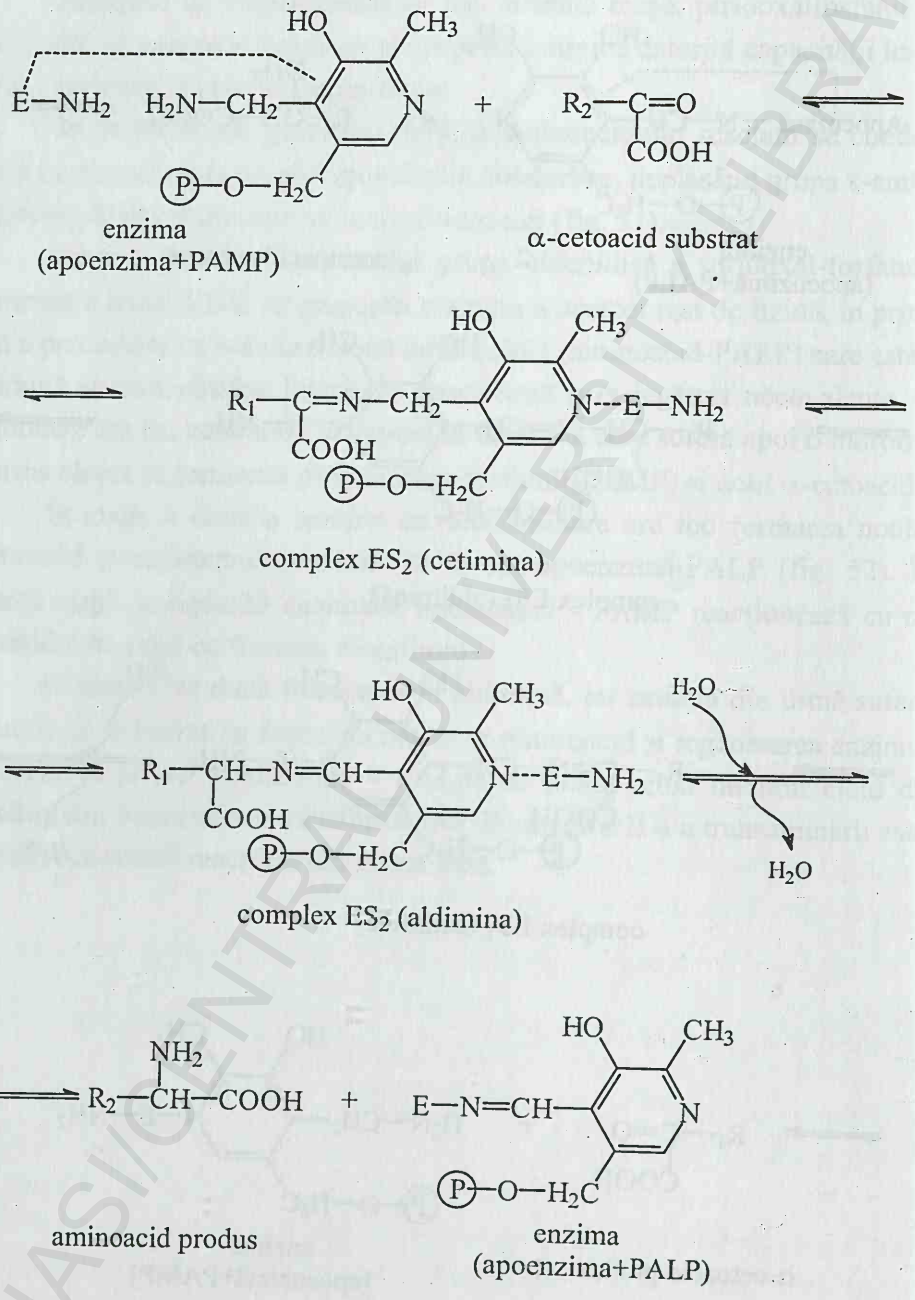
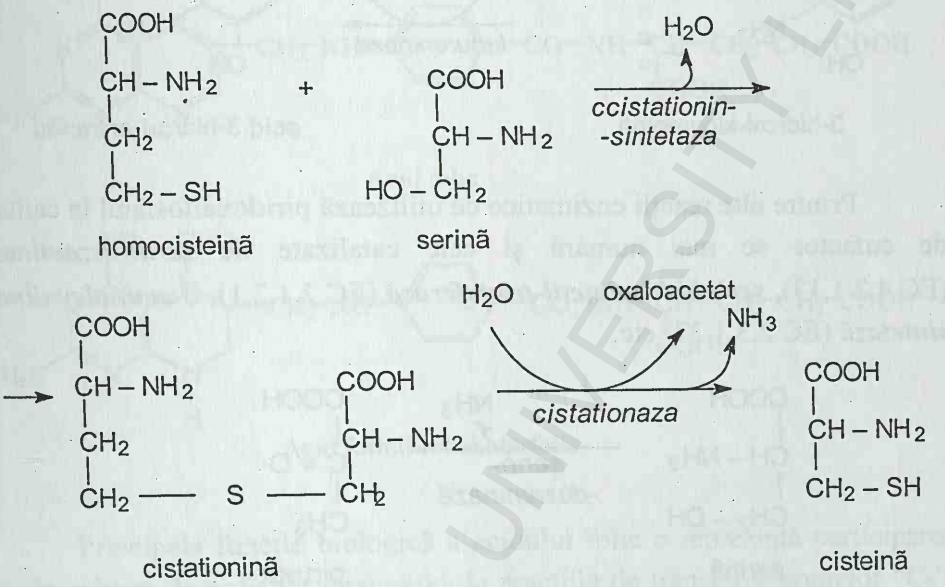


Fig. 52. Mecanismul reacției de transaminare. Formarea aminoacidului

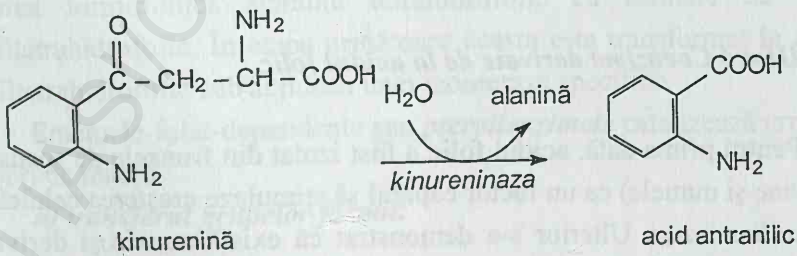
În afară de reacțiile de decarboxilare și transaminare, piridoxalfosfatul este implicat și în alte secvențe ale metabolismului aminoacizilor. Astfel,

BCU IAȘI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

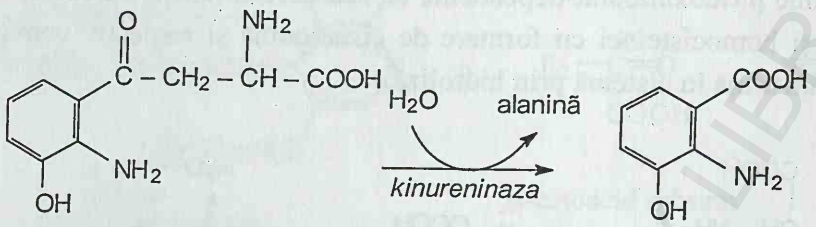
cistationin-sintetaza (EC 4.2.1.22) şi respectiv ***cistationaza*** (EC 4.2.1.1) sunt două enzime piridoxalfosfat-dependente ce catalizează reacţia de condensare a serinei şi homocisteinei cu formare de cistationină şi respectiv conversia acesteia din urmă în cisteină prin hidroliză.



Degradarea oxidativă a triptofanului sub acţiunea triptofan-pirolazei are loc cu formare de kinurenină şi 3-hidroxi-kinurenină. Ulterior, aceşti metaboliţi sunt transformaţi în acid antranilic, respectiv acid 3-hidroxi-antranilic sub acţiunea ***kinureninazei*** (EC 3.7.1.3), o enzimă piridoxalfosfat-dependentă.

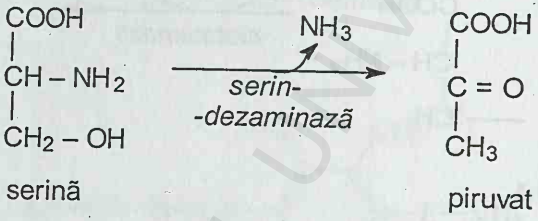


şi respectiv:

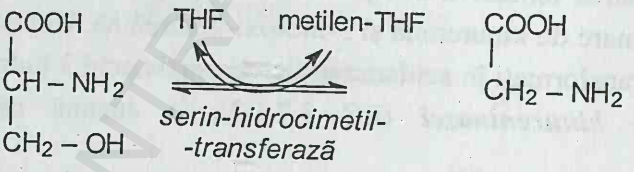


3-hidroxi-kinureninã acid 3-hidroxi-antranilic

Printre alte reacţii enzimatice ce utilizează piridoxalfosfatul în calitate de cofactor se mai numără şi cele catalizate de ***serin-dezaminază*** (EC 4.2.1.13), ***serinhidroximetil-transferază*** (EC 2.1.2.1), ***δ-aminolevulinat-sintetază*** (EC 2.3.1.37) etc.



serinã piruvat

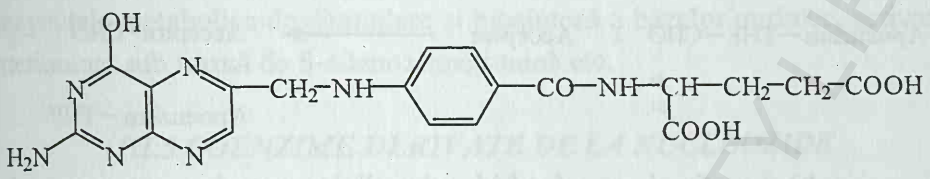


serinã glicocol

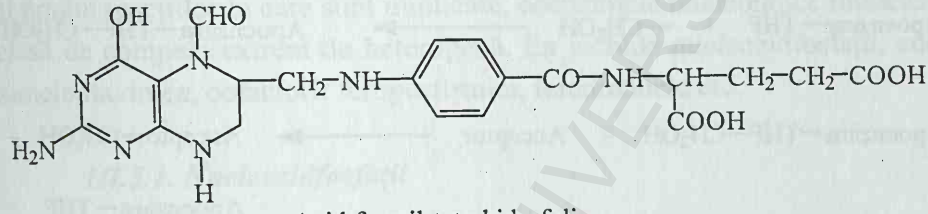
III.4.4 Coenzime derivate de la acidul folic

Pentru prima dată, acidul folic a fost izolat din frunzele de spanac (de unde-i vine şi numele) ca un factor capabil să stimuleze creşterea celulelor de *Lactobacillus casei*. Ulterior s-a demonstrat că există numeroşi derivaţi ai acidului folic cu acţiune biologică identică pentru organismul uman şi animal. Din punct de vedere structural, acidul folic, sau acidul pteroil-glutamic, conţine în molecula sa un rest de acid pteroic, un rest de acid p-aminobenzoic

şi un rest de acid glutamic. Forma activă a acestuia este acidul 5-formil-5,6,7,8-tetrahidrofolic (FH_4 sau THF):



Acid folic



Acid formil-tetrahidrofolic

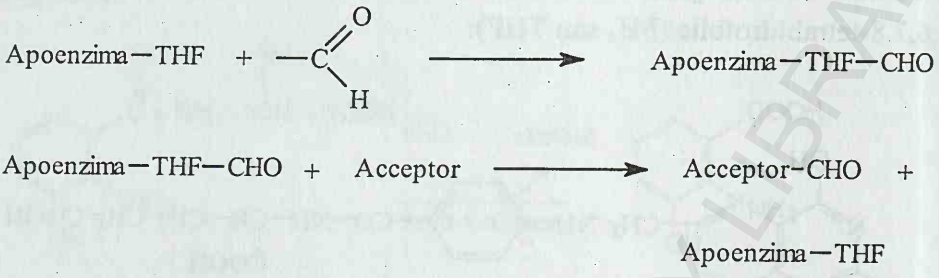
Principala funcţie biologică a acidului folic o reprezintă participarea sa, în calitate de cofactor enzimatic, la reacţiile de transfer a grupelor "C_1". Principalele coenzime derivate de la acidul folic sunt: acidul 5-formil-5,6,7,8-tetrahidrofolic, acidul 10-formil-5,6,7,8-tetrahidrofolic, acidul 5,10-metilen-5,6,7,8-tetrahidrofolic, acidul 5-formimino-5,6,7,8-tetrahidrofolic şi acidul 5-metil-5,6,7,8-tetrahidrofolic.

Acidul formil-tetrahidrofolic este, în general, biologic inactiv cu o singură excepţie. După transformarea histidinei în acid urocanic, apoi în acid imidazolon-propionic, se formează acidul N-formiminoglutamic care cedează gruparea formiminică acidului tetrahidrofolic cu formare de acid 5-formiltetrahidrofolic. În etapa următoare acesta este transformat în acid 10-formiltetrahidrofolic sub acţiunea unei izomeraze specifice.

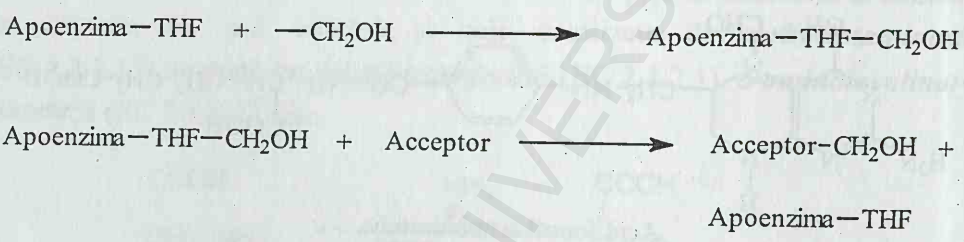
Enzimele folat-dependente sau ***pteroilenzimele*** catalizează următoarele tipuri de reacţii :

a) transferul grupelor formil:

BCU IAŞI - UNIVERSITY LIBRARY

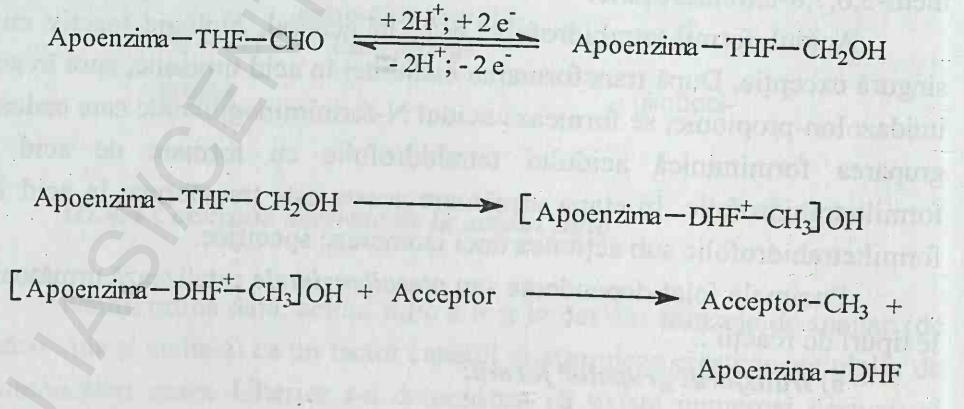


b) ***transferul grupelor hidroximetil*** decurge, de asemenea, în două etape:



Acest tip de reacții este des întîlnit în procesele de oximetilare şi transoximetilare cum ar fi, de exemplu, conversia glicocolului în serină;

c) transferul grupelor formil simultan cu reducerea acestora se realizează în reacții reversibile catalizate de pteroilenzime în prezența unor donori, respectiv acceptori de hidrogen (NADH şi/sau NADPH şi respectiv NAD^+ şi/sau $NADP^+$):



BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

d) reacții de metilare prin utilizarea grupărilor hidroximetil când grupele -CH_2OH sunt transformate în grupe -CH_3, iar coenzima trece din forma de acid tetrahidrofolic (THF) în acid dihidrofolic (DHF):

Cele mai importante reacții catalizate de pteroilenzime fac parte din secvențele metabolice de degradare şi biosinteză a bazelor purinice, activarea metioninei sub formă de S-adenozilmetionină etc.

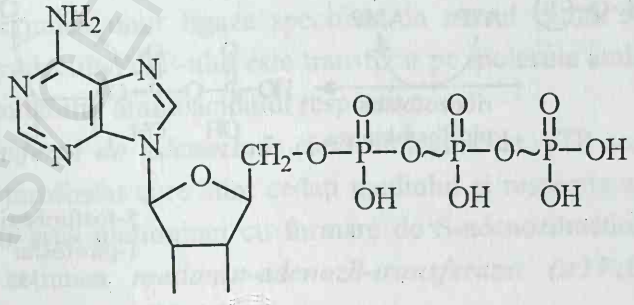
III.5 COENZIME DERIVATE DE LA NUCLEOZIDE

Atât din punct de vedere structural cât şi al mecanismului de acțiune şi tipului reacțiilor în care sunt implicate, coenzimele nucleotidice formează o clasă de compuşi extrem de heterogenă. Ea include nucleozidfosfații, coenzimele flavinice, cofactorii feroporfirinici, feredoxinele etc.

III.5.1. Nucleozidfosfații

Nucleozid-trifosfații îndeplinesc rol de cofactori în reacțiile de transfosforilare, enzimele ce catalizează aceste procese fiind desemnate prin termenul de ***kinaze*** (subclasa 2.7.1.). Nucleozidfosfații conțin în moleculă atât baze azotate purinice cât şi pirimidinice.

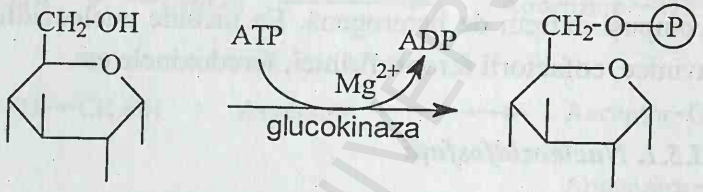
Acidul adenozintrifosforic (ATP) constituie principalul transportor de grupări fosfat şi în acelaşi timp, principalul compus macroergic al celulei vii. Din punct de vedere structural, el este un nucleotid trifosforilat al adenozinei la hidroxilul din poziția 5':



Radicalii ortofosfat sunt legați între ei prin legături mult mai bogate în energie comparativ cu alți esteri fosforici (aproximativ 8 kcal/mol față de 3 kcal/mol) din care cauză ele sunt numite ***legături macroergice.*** Adevărata

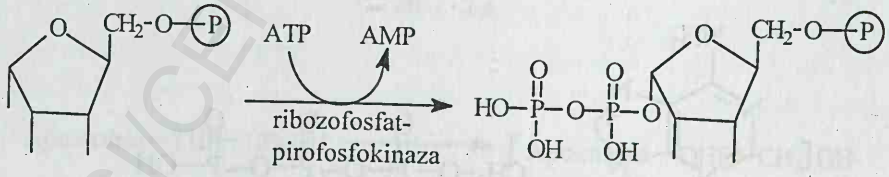
funcție biologică a ATP-ului o constituie capacitatea realizării transferului de energie când o parte a moleculei (restul ortofosfat şi mai rar radicalul pirofosfat) poate fi transferată pe un acceptor care se activează, sau mediului. În diferite secvențe metabolice, molecula de ATP poate fi scindată în mod diferit, cel de-al doilea substrat putând accepta cel puțin patru fragmente ale sale:

- ***transferul radicalului ortofosfat*** are loc sub acțiunea a numeroase fosfotransferaze sau kinaze. De exemplu, activarea glucozei cu formare de glucozo-6-fosfat are loc sub acțiunea ***glucokinazei (ATP:D-glucozo-6-fosfotransferaza***, EC 2.7.1.2):



D-glucoză glucozo-6-fosfat

- ***transferul radicalului pirofosfat*** se realizează sub acțiunea unor enzime specifice numite ***pirofosfotransferaze*** sau ***pirofosfokinaze*** ce sunt reunite în subclasa 2.7.6. De exemplu, conversia ribozo-5-fosfatului în fosforibozil-pirofosfat are loc sub acțiunea ***ribozofosfat-pirofosfokinazei (ATP:D-ribozo-5-fosfat-pirofosfotransferaza***, EC 2.7.6.1):



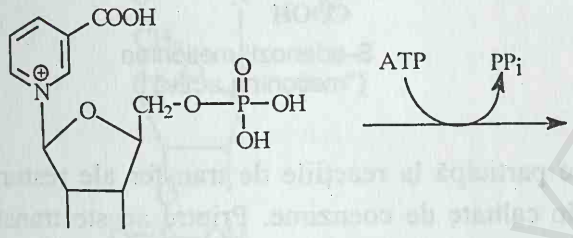
D-ribozo-5-fosfat

5-fosforibozil-1-pirofosfat

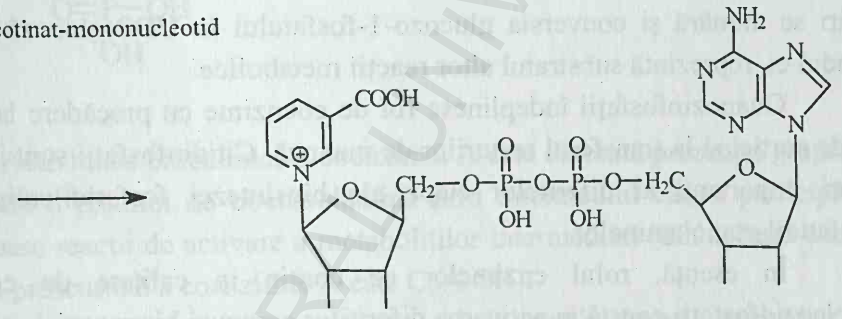
Această reacție constituie prima etapă a biosintezei bazelor azotate purinice;

BCU IAȘI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

- ***transferul radicalului adenilat*** are loc prin scindarea moleculei de ATP în acid adenilic şi pirofosfat sub acţiunea ***nucleotidiltransferazelor*** (subclasa 2.7.7.). Radicalul pirofosfat este eliberat în mediu, iar restul de acid adenilic este transferat pe un acceptor. Astfel, în cazul biosintezei coenzimelor nicotinamidice, penultima etapă în biosinteza NAD^+-ului o constituie conversia nicotinat-ribonucleotidului în dezamino-NAD^+ sub acţiunea ***dezamino – NAD^+ - pirofosforilazei (ATP : nicotinat – mononucleotid - adenilil-transferaza***, EC 2.7.7.1):



nicotinat-mononucleotid

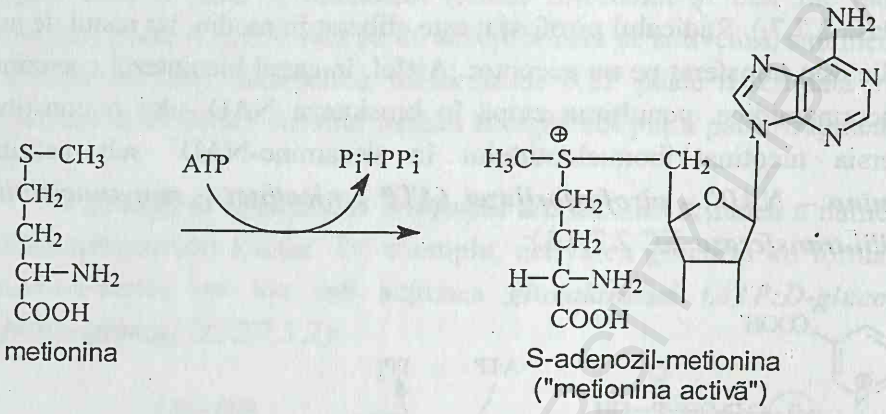


dezamino-NAD

Prin mecanisme asemănătoare au loc şi reacţiile de activare a aminoacizilor sub acţiunea unor ligaze specifice, în cursul cărora restul de acid adenilic din molecula ATP-ului este transferat pe molecula aminoacidului cu formarea adenilatului aminoacidului respectiv;

- ***transferul de adenozină***, când molecula de ATP se scindează în ortofosfat şi pirofosfat care sunt cedaţi mediului şi respectiv adenozină. De exemplu, activarea metioninei cu formare de S-adenozilmetionină se realizează sub acţiunea ***metionin-adenozil-transferazei (ATP:L-metionin-S-adenozil-transferaza***, EC 2.4.2.13):

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY



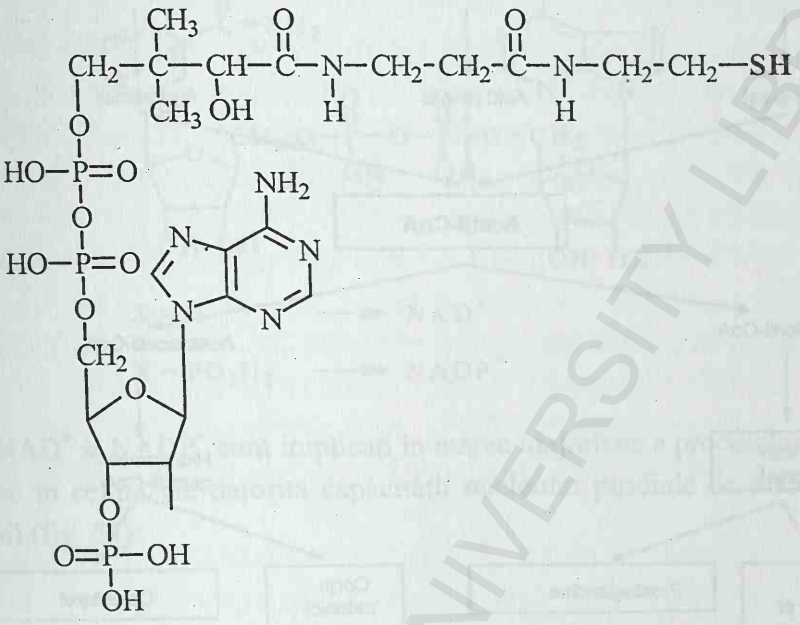
Numeroase enzime ce participă la reacțiile de transfer ale resturilor glicozil conțin uridinfosfați în calitate de coenzime. Printre aceste transformări se numără și conversia glucozo-1-fosfatului în UDP-glucoză care, la rândul ei, reprezintă substratul altor reacții metabolice.

Guanozinfosfații îndeplinesc rol de coenzime cu precădere la drojdii unde participă la transferul resturilor de manoză. Citidinfosfații sunt intermediari importanți ai diferitelor etape ale biosintezei fosfatidilcolinelor și fosfatidil-etanolaminelor.

În esență, rolul enzimelor ce conțin în calitate de cofactori nucleozidfosfații constă în activarea diferiților compuși bioorganici prin utilizarea energiei din legăturile lor macroergice.

III.5.2 Coenzima A

Forma sub care acidul pantotenic joacă rol coenzimatic în metabolismul celular este compusul numit ***coenzimă A*** ce conține în molecula sa un rest de acid adenilic, un rest pirofosfat, un rest de acid pantotenic și un rest de tioetanolamină (cisteamină):



Activitatea biochimică a coenzimei A este datorată prezenței grupei –SH libere a restului de tioetanolamină prin intermediul căreia participă la numeroase reacții de activare a metaboliților intermediari (din această cauză, notarea prescurtată a coenzimei A este CoA-SH).

Acest cofactor joacă un rol deosebit în metabolismul intermediar reprezentând o adevărată placă turnantă în metabolismul celular (fig. 53). Pe de o parte, acidul acetic rezultat prin degradarea parțială a glucidelor, lipidelor, proteinelor etc. este activat sub formă de acetil-CoA, iar pe de altă parte acesta servește drept precursor în biosinteza proteinelor, lipidelor și hormonilor steroizi sau se degradează în continuare prin ciclul acizilor tricarboxilici.

BCU IAȘI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

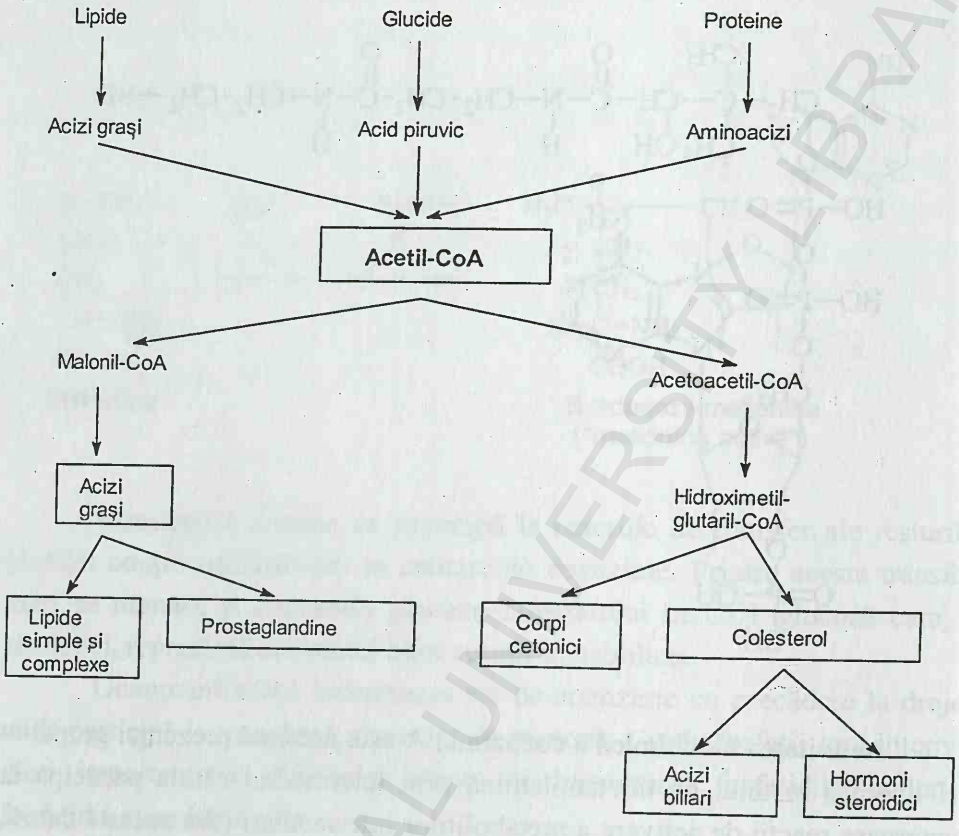
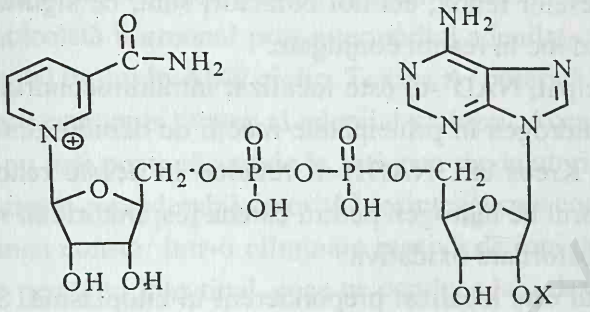


Fig. 53. Rolul coenzimei A în metabolismul celular

III.5.3 Coenzime piridin-nucleotidice

Coenzimele piridinice joacă un rol deosebit în oxidoreducerile celulare, acestea reprezentînd funcția biologică principală a vitaminei PP. În organismele vii, vitamina PP se găsește preponderent sub forma a două nucleotide piridinice: ***nicotinamidadenindinucleotid*** (NAD^+) și respectiv ***nicotinamidadenindinucleotid-fosfat*** ($NADP^+$):

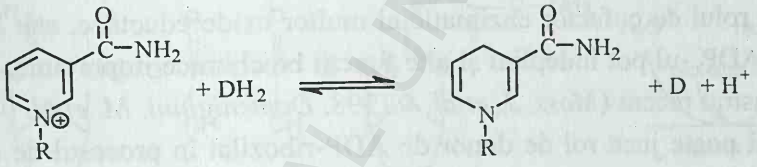
BCU IAȘI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY



X = H ⟶ NAD^+

X = PO_3H_2 ⟶ $NADP^+$

NAD^+ şi $NADP^+$ sunt implicaţi în marea majoritate a proceselor redox ce au loc în celula vie datorită capacităţii nucleului piridinic de a se oxida reversibil (fig. 54):



sau :

$NAD(P)^+ + S \rightleftharpoons NAD(P)H + P + H^+$

Fig. 54. Mecanismul general al oxidoreducerilor catalizate de enzime piridin-nucleotidice

În reacţiile de dehidrogenare a diferitelor substrate, un atom de hidrogen al donorului se leagă de atomul de carbon C_4 al nucleului piridinic, iar celălalt atom de hidrogen, cedând electronul său pentru neutralizarea sarcinii pozitive a heterociclului, este eliminat în mediu sub formă de proton. Din punctul de vedere al mecanismului de acţiune, precum şi al modului de legare a NAD^+ şi $NADP^+$ de apoenzime, nu se poate spune că aceşti cofactori sunt coenzime sau grupări prostetice. Deseori, NAD^+ şi $NADP^+$ pot fi consideraţi mai degrabă cosubstrate ale enzimelor la care sunt asociaţi. Cel puţin pentru

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

o etapă a proceselor redox, cei doi cofactori sunt, cu siguranță substrate, regenerarea având loc în reacții conjugate.

În principal, NAD^+-ul este localizat intramitocondrial unde constituie acceptorul de hidrogen în principalele reacții de dehidrogenare din glicoliză, lipoliză, ciclul Krebs etc. NADH-ul rezultat în aceste reacții constituie, la rândul lui, donorul de hidrogen pentru catena respiratorie în vederea realizării procesului de fosforilare oxidativă.

NADP-ul este localizat preponderent în citoplasmă. Sub forma sa redusă el reprezintă principalul donor de hidrogen în reacțiile de transhidrogenare din organismele vii, de exemplu în biosinteza acizilor grași. După oxidarea în aceste reacții, $NADPH^+$ trebuie să se regenereze, reducându-se în reacții conjugate. Această "reîncărcare" are loc, în principal, în calea pentozo-fosfaților atunci când calea Embden-Meyerhoff-Parnas este saturată.

Coenzimele piridin-nucleotidice sunt implicate în numeroase procese biochimice și fiziologice normale și patologice ce au loc la nivel celular. În afară de rolul de cofactor enzimatic al multor oxidoreductaze, atât NAD^+ -ul cât și $NADP^+$-ul pot îndeplini și alte funcții biochimice importante. Astfel, s-a demonstrat recent (*Moss, J. et al.* – 1998, *Domenighini, M. et al.* – 1995) că NAD^+-ul poate juca rol de donor de ADP-ribozilat în procesul de cuplare a toxinei A_1 holerice cu proteina G.

Toxinele bacteriene reprezintă un caz particular foarte interesant de fixare covalentă a nucleotidelor. Datorită importanței medicale deosebite, au fost studiate și din punct de vedere biochimic toxinele holerei, difteriei și al tusei convulsive. Simptomele bine cunoscute ale holerei sunt cauzate de o toxină produsă de *Vibrio cholerae*. Aceasta este o preoteină oligomeră cu o masă moleculară de 87 kDa a cărei moleculă conține șapte subunități: o subunitate A_1 legată printr-o punte disulfidică de subunitatea A_2 și cinci subunități B.

Mecanismul evoluției procesului patologic este declanșat de interacțiunea toxinei holerice cu gangliozidul GM localizat intramembranar, interacțiune ce este posibilă datorită faptului că acest glicolipid recunoaște subunitățile B ale toxinei. Subunitatea A_1, cu o masă moleculară de 23 kDa, poate fi izolată prin reducerea punții disulfidice. Și sub forma sa liberă (clivată de restul toxinei), această subunitate pătrunde în celulă unde declanșează evoluția bolii.

Se cunoaşte faptul că excreţia apei şi a ionilor de Na^+ de către peretele intestinal este controlată hormonal prin intermediul adenilat-ciclazei ce catalizează conversia ATP-ului în AMP ciclic. Toxina A_1 holerică interacţionează cu proteina G care este un activator al adenilat-ciclazei. Această enzimă este astfel blocată şi nu mai poate răspunde la acţiunea modulatorilor săi, iar concentraţia AMP_c creşte considerabil datorită biosintezei sale continue. Rezultatul acestui fenomen constă într-o eliminare masivă de ioni de clor şi de apă de către celulele peretelui intestinal, ceea ce conduce la o deshidratare puternică.

Toxina A_1 holerică fixează pe proteina G un rest de ADP ribozilat ce provine de la NAD^+. Molecula acestuia suferă o scindare hidrolitică la nivelul legăturii N-glicozidice, legătură ce ataşează restul de riboză la nucleul nicotinamidei (fig. 55).

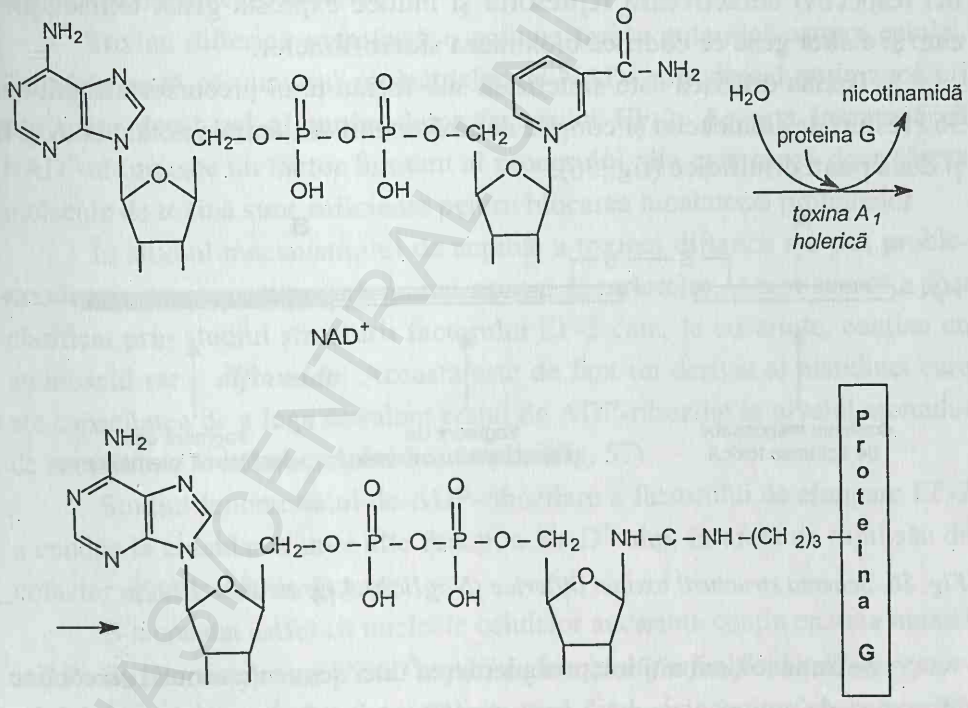


Fig. 55. Legarea restului de ADN ribozilat de proteina G sub acţiunea toxinei A_1

Fragmentul de ADN ribozilat se leagă covalent la nivelul unui rest de arginină din structura proteinei G. Legătura formată este o legătură puternică astfel încât proteina G este inactivată ireversibil.

Un rol asemănător îl joacă NAD^+-ul şi în acţiunea toxinei difterice (*Cabiaux, V. et al.* – 1994). Modul de acţiune al toxinei difterice este asemănător cu cel al toxinei holerice chiar dacă locul acţiunii este diferit. Ceea ce este interesant este faptul că bacteria producătoare (*Corynebacterium diphteriae*) ca atare este inofensivă, ea producând toxina doar atunci când găzduieşte un fag (*Moss, J. et al.* – 1998).

Toxina este sintetizată la finele perioadei de creştere a populaţiei microbiene în condiţiile carenţei de fier. Toxina difterică este o proteină codificată de genomul bacterian ***DtxR*** care reglează expresia genei toxinei (*tox*) ce provine de la fag. Această proteină acţionează ca un represor atunci când leagă un ion de Fe^{2+} sau, eventual, de Mn^{2+}, Zn^{2+} sau Cd^{2+}. Lipsa ionilor metalici respectivi dezactivează represorul şi induce expresia genei toxinei, precum şi a altor gene ce codifică bioxinteza siderofilinelor.

Toxina difterică este sintetizată sub forma unui precursor alcătuit din 560 resturi de aminoacizi şi conţine două domenii structurale notate cu A şi B şi două punţi disulfidice (fig. 56).

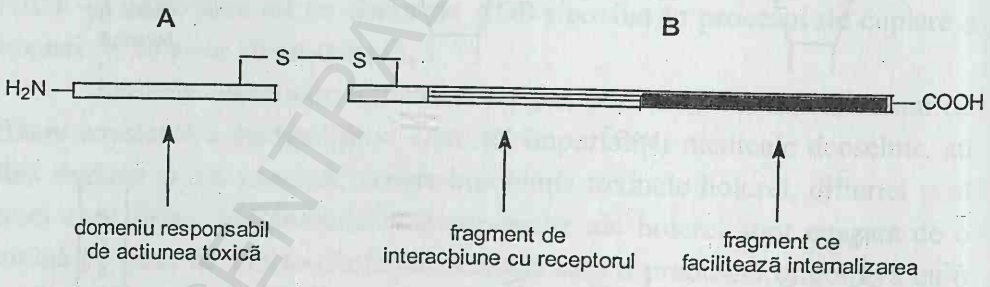


Fig. 56. Schema structurii toxinei difterice (Naglich, J.G. et al. – 1992)

Secreţia toxinei are loc prin pierderea unei secvenţe semnal ce conţine 25 resturi de aminoacizi, după care aceasta se leagă de receptorii celulelor ţintă, rămânând încă inactivă. După interacţiunea toxină – receptor, în molecula toxinei au loc modificări structurale profunde. În primul rând, domeniile A şi B se desprind, rămânând legate între ele doar prin intermediul uneia din cele două punţi disulfidice. Domeniul B (cu masa moleculară de 37,2kDa)

are rolul de a reacționa cu receptorul determinând legarea domeniului A (cu masa moleculară de 21,2 kDa) de membrana celulară.

Internalizarea receptorului este inițiată după fixarea domeniului B de membrană și se realizează prin endocitoză. Are loc apoi ruperea printr-un proces reducător a legăturii disulfidice ce unește cele două domenii, peptida A fiind injectată în citoplasmă printr-un mecanism incomplet elucidat în care, cu siguranță, diferite fragmente ale domeniul B joacă un rol hotărâtor (*Cabiaux, V. et al.* – 1994).

Odată ajuns în citoplasmă, domeniul A al toxinei inactivează factorul de elongare EF-2, care este o proteină ce face parte din familia proteinei G și care joacă un rol esențial în etapa de elongare a catenelor polipeptidice a procesului de biosinteză proteică la nivel ribosomal.

Inactivarea factorului EF-2 se realizează prin ADP-ribozilarea sa (prin utilizarea NAD^+-ului drept donor de radicali ADP-ribozil), ceea ce conduce la blocarea biosintezei proteice.

Toxina difterică manifestă o acțiune foarte puternică asupra celulei. Calculele arată că numărul moleculelor de NAD^+ este de cel puțin zece ori mai mare decât cel al moleculelor factorului EF-2. Aceasta înseamnă că NAD^+-ul nu este un factor limitant al procesului, din care cauză doar câteva molecule de toxină sunt suficiente pentru blocarea biosintezei proteinelor.

În studiul mecanismului de acțiune a toxinei difterice s-a pus problema de ce aceasta acționează numai asupra eucariotelor. Acest aspect a fost clarificat prin studiul structurii factorului EF-2 care, la eucariote, conține un aminoacid rar – ***diftamida***. Aceasta este de fapt un derivat al histidinei care are capacitatea de a lega covalent restul de ADP-ribozilat la nivelul atomului de azot iminic al heterociclului imidazolic (fig. 57).

Studiul fenomenului de ADP-ribozilare a factorului de elongare EF-2 a condus la elucidarea unei alte funcții a NAD^+-ului, în afară de rolul său de cofactor al unor dehidrogenaze.

S-a constat astfel că nucleele celulelor aucariote conțin enzima numită ***ADP-ribozil-transferaza*** [***NAD^+ : poli (adenozindifosfat-β-ribozil)-acceptor-β-ribozil-transferaza***, EC 2.4.2.30] al cărui rol constă în grefarea resturilor ADP-ribozil pe diferite proteine și în special pe histone. În același timp, nucleele conțin și o ***poli(ADP-riboză)-glicohidrolază*** care are rolul de a depolimeriza poli-ADP-riboza, precum și o ***ADP-ribozil-protein-liază*** care îndepărtează toate resturile de ADP-riboză din proteina respectivă.

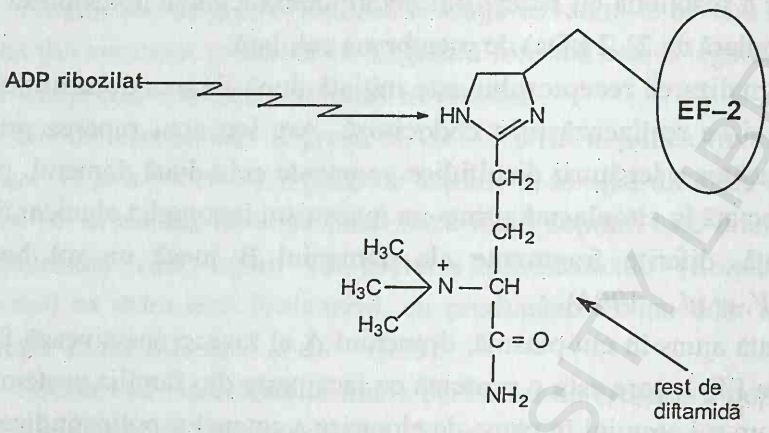


Fig. 57. Schema fenomenului de ADP-ribozilare a factorului EF-2

În toate aceste procese de modificare a proteinelor, tot NAD^+-ul este donorul de radicali ADP-riboză însă mecanismul este oarecum diferit de cel întâlnit în cazul acțiunii toxinelor, în sensul că legarea se face la nivelul unor grupe –COOH libere. Se formează astfel un polimer special în care resturile de riboză se leagă între ele prin legături 1',2'–glicozidice (fig. 58).

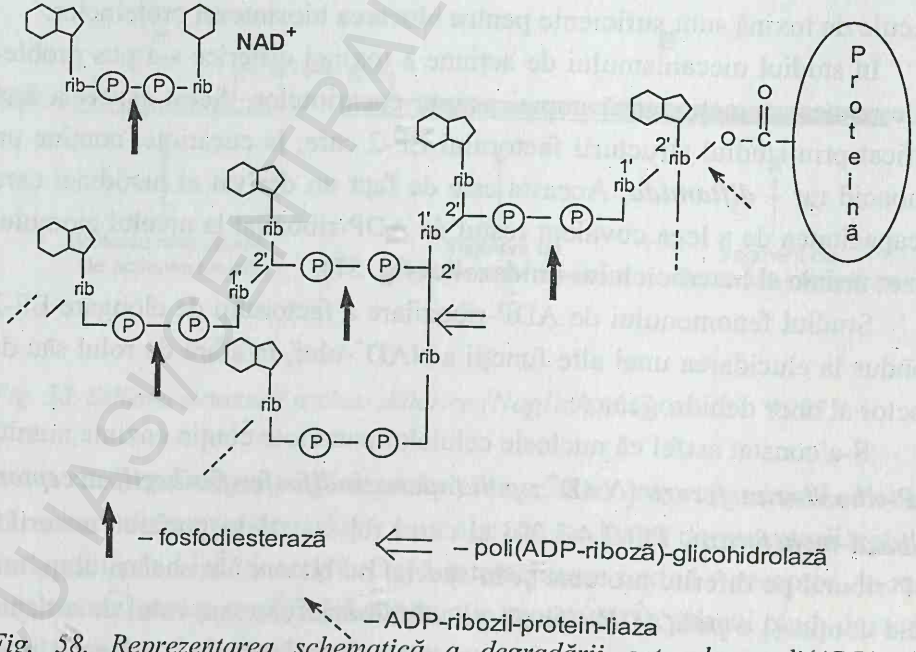


Fig. 58. Reprezentarea schematică a degradării catenelor poli(ADP)-ribozil (Sekine, A. et al. – 1989)

BCU IAȘI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Legătura β-N-glicozidică din NAD^+ corespunde unei energii standard de hidroliză de – 34,4 kJ/mol la pK = 7,0 şi 25°C, adică este de acelaşi ordin de mărime cu energia furnizată prin hidroliza ATP-ului. Aceasta înseamnă că există o oarecare similitudine între rolul ATP-ului şi cel al NAD^+-ului cu deosebirea că în reacţiile de ADP-ribozilare a proteinelor, NAD^+-ul este donor de radicali ADP-ribozil, în timp ce ATP-ul cedează radicalul ortofosfat terminal (sub acţiunea kinazelor specifice).

Procesul de ADP-ribozilare a unor proteine are loc în două etape distincte. Într-o primă fază, adiţia radicalului ADP-riboză se face la nivelul unei grupe –COOH libere din structura proteinei respective, iar în etapa următoare, catena de poli(ADP-riboză) suferă un proces de elongare prin adiţia succesivă de noi resturi de ADP-riboză, cu condiţia ca NAD^+-ul să se regenereze continuu (fig. 59).

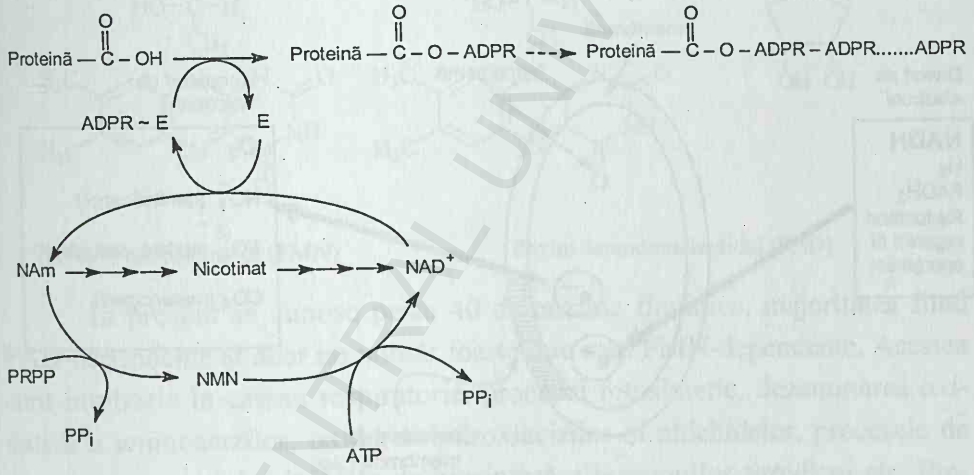


Fig. 59. Schema ADP-zibozilării proteinelor (Gaal, J. et al.- 1992

ADPR – ADP-riboză

E – ADP-ribozil-transferaza

PRPP – fosforibozilpirofosfat

NMN – nicotinat-mononucleotid

PP_i – pirofosfat

Nam – nicotinamidă

După cum s-a arătat mai sus, NAD^+-ul (deci forma oxidată a acestei coenzime) se regenerează în urma unei multitudini de reacții enzimatice în care are loc reducerea diferitelor substrate sub acțiunea reductazelor NADH-dependente specifice. O situație interesantă se întâlnește la unele bacterii în procesul de respirație. Se cunoaște faptul că în condiții de mediu favorabile, în celulele bacteriene au loc o serie de procese de oxidare foarte intense în care sunt implicate numeroase enzime specifice – citocromii și diferiți agenți transportori. Electronii intrați în catena respiratorie bacteriană pot proveni de la NADH sau de la diverși compuși cum ar fi lactatul sau succinatul care se oxidează sub acțiunea dehidrogenazelor flavinice respective. Atunci când celula bacteriană aerobă este distrusă, în fracțiunile membranare obținute continuă procesul de oxidare a NADH-ului în prezența oxigenului, acestea comportându-se ca o NADH-oxidază (fig. 60).

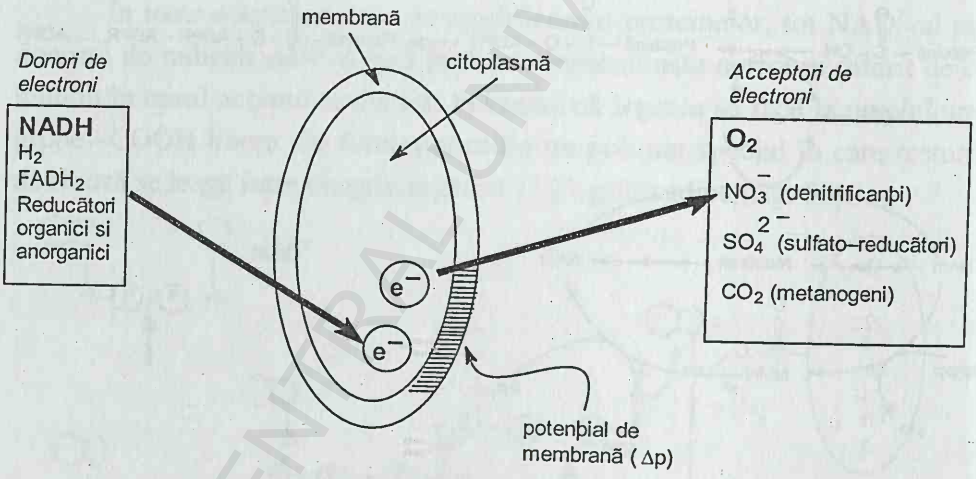
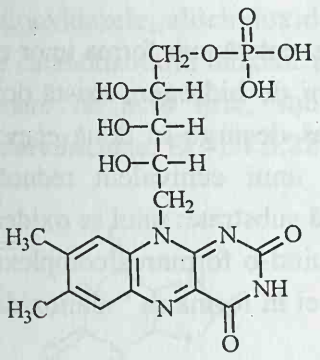


Fig. 60. Reprezentarea schematică a posibilităților de reoxidare a NADH-ului la bacterii (Pelmont, J. – 1995)

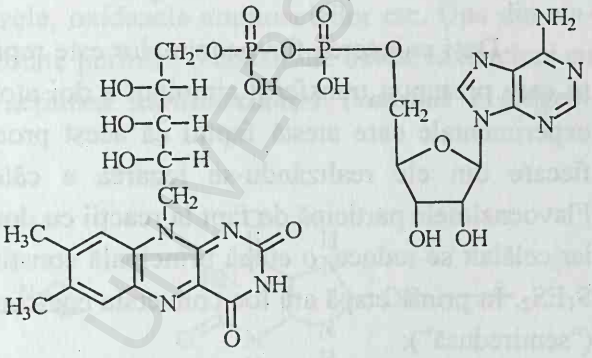
În acest caz, procesul de respirație poate fi definit ca fiind un proces oxido-reducător ce are loc preponderent la nivel membranar și care este cuplat cu procesul de formare a potențialului electrochimic transmembranar. Acest potențial este generat de transferul electronilor la nivelul anumitor transportori numiți ***situsuri de cuplare*** și reprezintă, la rândul său, forța motrice necesară cintezei ATP-ului din ADP și ortofosfat.

III.5.4 Coenzime flavinice

Alături de coenzimele piridinice, coenzimele flavinice joacă un rol important în oxidoreducerile enzimatice, reprezentând cofactorii unor oxidoreductaze specifice. Coenzimele flavinice sunt derivați nucleotidici ai riboflavinei (vitamina B_2), existând doi compuși cu rol coenzimatic: ***flavinmononucleotidul*** (FMN) și respectiv ***flavinadenindinucleotidul*** (FAD).



flavinmononucleotidul (FMN)



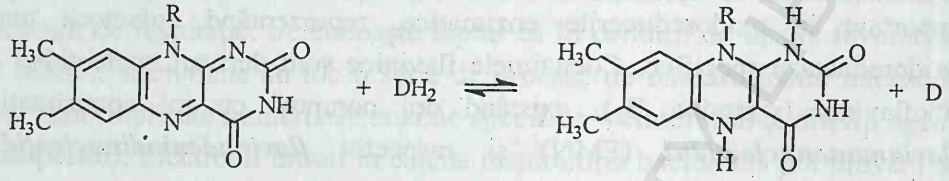
flavinadenindinucleotidul (FAD)

În prezent se cunosc peste 40 de enzime flavinice, majoritatea fiind FAD-dependente și doar un număr foarte mic sunt FMN-dependente. Acestea sunt implicate în catena respiratorie, procesul fotosintetic, dezaminarea oxidativă a aminoacizilor, oxidarea hidroxiacizilor și aldehidelor, procesele de incorporare a iodului în căile de biosinteză a hormonilor tiroidieni etc. Precursorul imediat al coenzimelor flavinice îl constituie riboflavina (vitamina B_2) care trece în FMN prin fosforilare sub acțiunea ***flavokinazei***. Acesta este convertit apoi în FAD sub acțiunea ***FAD-pirofosforilazei***:

$$\textbf{Riboflavina} \underset{\textit{FMN-fosfataza}}{\overset{\textit{flavokinaza}}{\rightleftharpoons}} \textbf{FMN} \underset{\textit{pirofosfataza}}{\overset{\textit{FAD-pirofosforilaza}}{\rightleftharpoons}} \textbf{FAD}$$

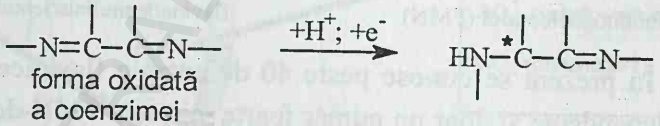
Partea activă a coenzimelor flavinice, responsabilă de realizarea proceselor redox la care acestea participă o constituie sistemul de două legături duble conjugate din ciclurile II și III ale nucleului izoaloxazinic. În reacțiile

de dehidrogenare catalizate de flavoenzime, acest sistem de legături duble are capacitatea de a da reacție de adiție 1,4 similară cu cea de la diene, iar în procesele de reducere are loc reacția inversă:



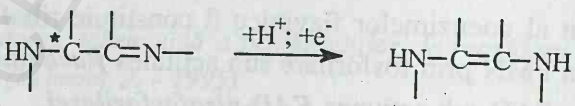
FMN (FAD) Donor de hidrogen $FMNH_2$ ($FADH_2$)

Deşi reducerea flavoenzimelor este reprezentată sub forma unor reacții care presupun transferul simultan a doi atomi de hidrogen, există dovezi experimentale care atestă faptul că acest proces decurge în două etape, în fiecare din ele realizându-se legarea a câte unui echivalent reducător. Flavoenzimele participă de fapt la reacții cu două substrate: unul se oxidează, iar celălalt se reduce, o etapă principală constituind-o formarea complexului S_1ES_2. În prima etapă are loc conversia coenzimei în forma sa "semioxidată" ("semiredusă"):



forma oxidată a coenzimei

În faza următoare este acceptat cel de al doilea atom de hidrogen, coenzima trecând în forma redusă:



forma redusă a coenzimei

Forma semioxidată a nucleului izoaloxazinic nu poate exista sub forma radicalului liber. În realitate se instalează un echilibru între două forme limită în care protonul migrează pentru stabilizarea radicalului:

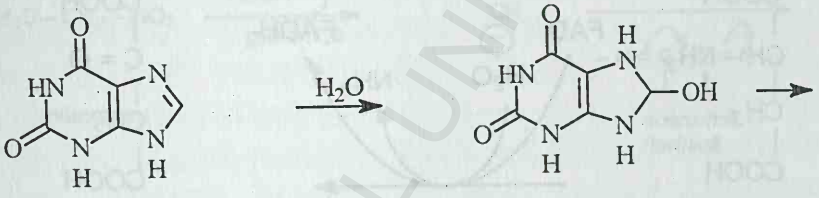
forma limită I forma limită II

Aceste fenomene au loc continuu, până în momentul în care apare al doilea atom de hidrogen.

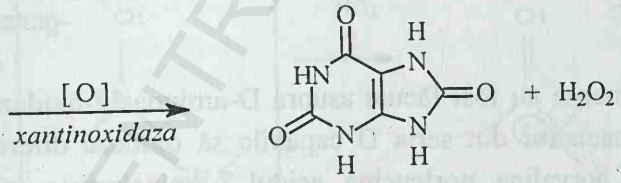
Flavoenzimele reprezintă o grupă importantă de oxidoreductaze, cele cunoscute până în prezent clasificându-se în patru subgrupe :

- oxidaze flavinice
- dehidrogenaze flavinice
- NAD(P)H-dehidrogenaze
- alte enzime flavinice.

a) Oxidazele flavinice sunt enzime implicate în transferul protonilor direct la oxigen. Cele mai importante enzime din această subgrupă sunt xantinoxidazele, aldehidoxidazele, oxidazele aminoacizilor etc. Una din etapele catabolismului bazelor azotate purinice o constituie oxidarea xantinei cu formare de acid uric, sub acțiunea ***xantinoxidazei (xantină : oxigen-oxidoreductaza***, EC 1.1.3.22):



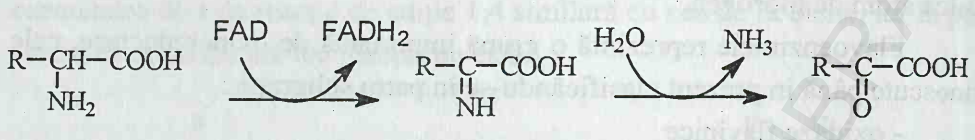
xantina



acid uric

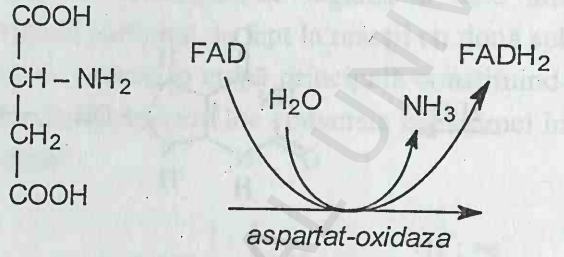
Xantinoxidaza este în același timp și o metaloenzimă care conține molibden, ionul metalic fiind absolut indispensabil activității catalitice. Aminoacidoxidazele sunt flavoenzime cu o înaltă specificitate de acțiune ce catalizează dezaminarea oxidativă a aminoacizilor cu formare de α-cetoacizi:

BCU MS CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY



α-aminoacid α-iminoacid α-cetoacid

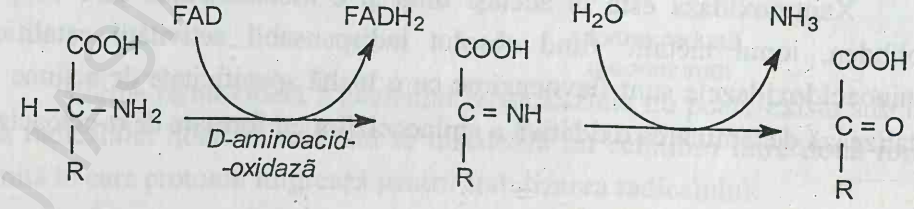
Acidul aspartic, de exemplu, este dezaminat oxidativ sub acțiunea ***aspartat-oxidazei*** (***aspartat : oxigen - oxidoreductaza dezaminantă***, EC 1.4.3.1) cu formare de α-cetoglutarat. În mod similar, ceilalți aminoacizi sunt transformați în α-cetoacizii corespunzători sub acțiunea aminoacid – oxidazelor specifice, FAD-dependente:



Acid aspartic

acid α-keto--glutaric

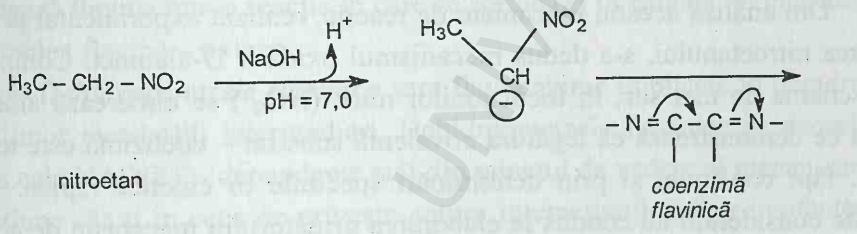
Studii intense au fost făcute asupra D-aminoacid-oxidazelor, enzime specifice aminoacizilor din seria D capabile să oxideze diferite substrate: alanina, valina, norvalina, norleucina, acidul 2-aminobutiric, metionina etc. Mai bine studiată este enzima din rinichiul de porc ce catalizează reacția:

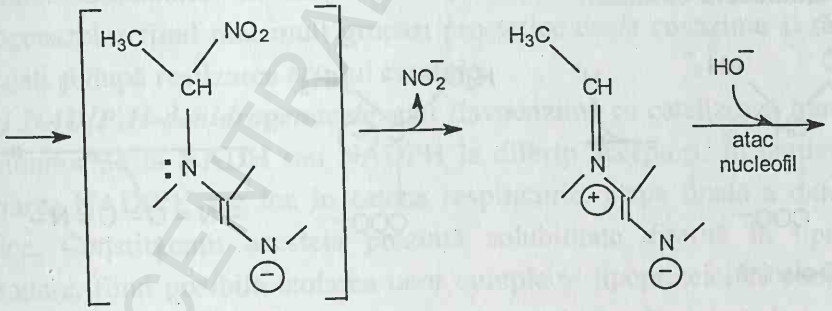


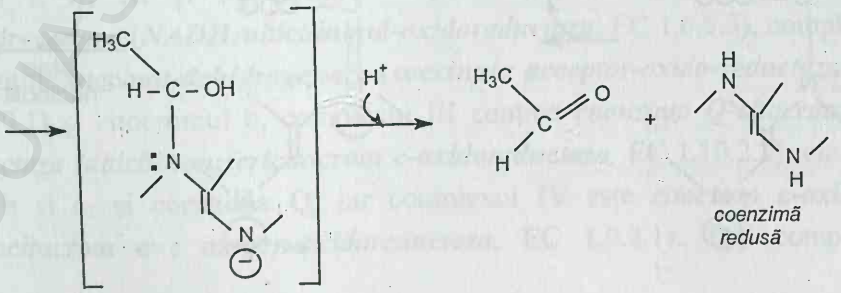
D-aminoacid iminoacid cetoacid

BCU IAȘI CENTRALĂ UNIVERSITARĂ LIBRARY

Ca şi în cazul oxidării aminoacizilor din seria L, acest proces are loc cu formarea iminoacidului corespunzător în calitate de intermediar, atomul de oxigen al cetoacidului provenind din molecula apei. Studiul mecanismului de acţiune al D-aminoacid-oxidazelor s-a făcut prin utilizarea în calitate de substrat a nitroetanului. Prin tratare cu NaOH, acest compus pune în libertate un carbanion colorat care este stabil la pH = 7,0 timp de câteva ore, iar sub acţiunea unei oxidaze flavinice se formează nitrilul corespunzător care poate fi dozat uşor (de exemplu prin tratare cu acid sulfanilic în mediu de HCl când se formează un derivat diazoic colorat). Dacă această reacţie se realizează în prezenţa ionilor CN^- ia naştere un complex covalent pe scheletul coenzimei flavinice. Această reacţie corespunde unei devieri de la mecanismul normal de acţiune a enzimei şi se realizează prin apariţia unui intermediar covalent instabil substrat – izoaloxazină:

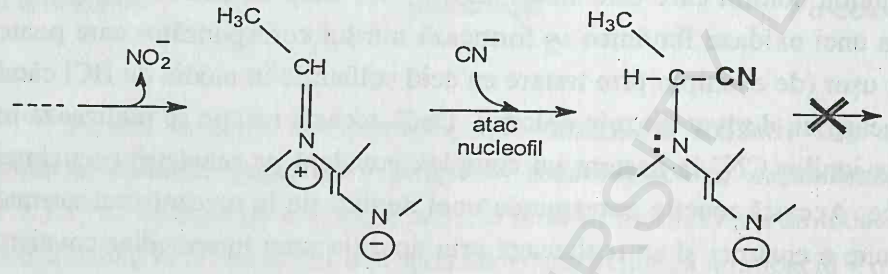




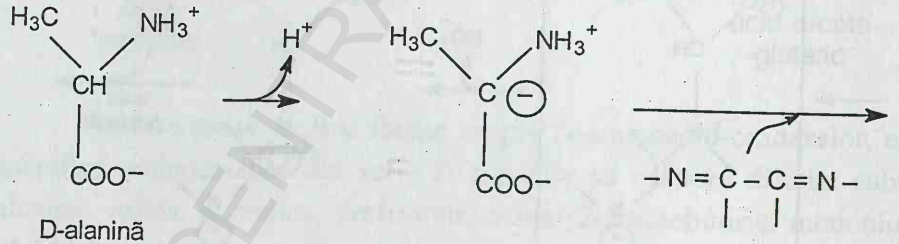


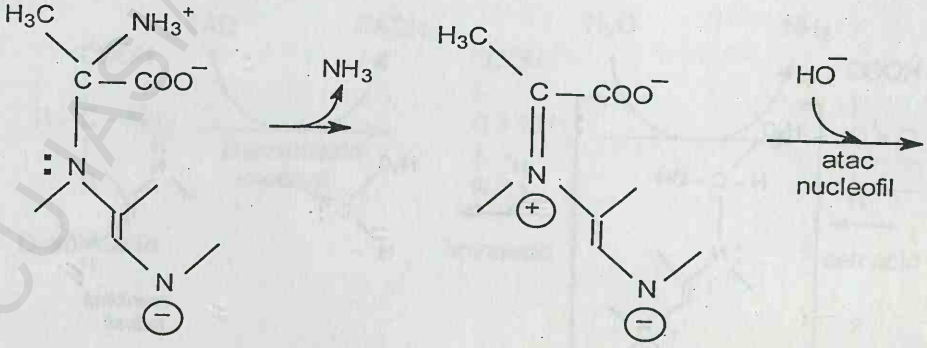
BCU MSI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

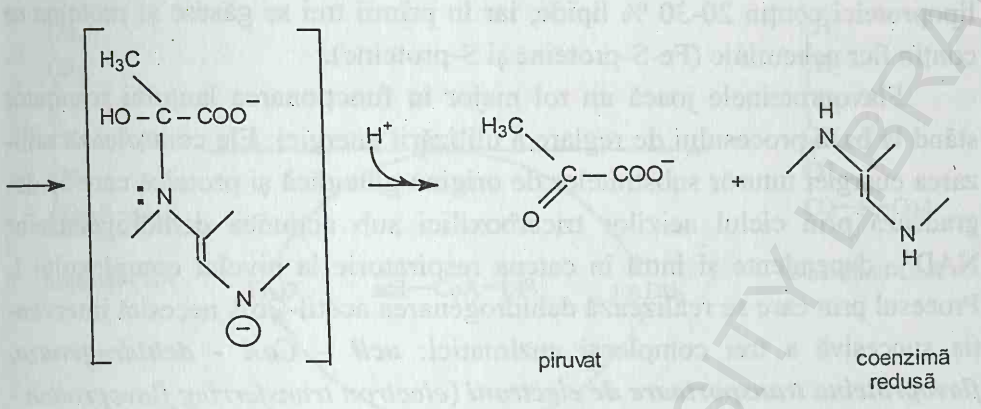
Dacă în mediu se adaugă ioni CN^-, aceştia vor interveni în etapa a II-a a procesului schematizat mai sus, înlocuind anionii HO^-. Prin utilizarea cianurilor marcate cu ^{14}C s-a demonstrat că se formează un complex covalent, rezistent la hidroliză:



Din analiza acestui mecanism de reacţie, realizat experimental prin utilizarea nitroetanului, s-a dedus mecanismul oxidării D-alaninei. Comparativ cu schema de mai sus, în locul ionilor nitrit (NO_2^-) se eliberează amoniac, ceea ce demonstrează că legătura covalentă substrat – coenzimă este temporară, fapt confirmat şi prin determinări spectrale în cinetică rapidă. Toate aceste consideraţii au condus la elaborarea următorului mecanism de acţiune a D-aminoacid-oxidazei:







Conform acestui mecanism, are loc conversia D-alaninei în piruvat, iar cofactorul enzimatic se reduce. Acceptorul final este oxigenul care reoxidează flavina într-o reacție în care se formează în calitate de intermediar un complex flavină – oxigen.

b) Dehidrogenazele flavinice sunt flavoenzime implicate în dehidrogenarea unor metaboliți intermediari. Dehidrogenazele flavinice se deosebesc net de cele NAD(P)$^+$– dependente atât din punctul de vedere al mecanismului de acțiune cât și în ceea ce privește natura interacțiunilor dintre cofactori și apoenzime. Cofactorii flavinici sunt puternic legați de apoenzimele dehidrogenazelor fiind mai mult grupări prostetice decât coenzime și rămânând legați și după realizarea actului catalitic.

c) NAD(P)H-dehidrogenazele sunt flavoenzime ce catalizează transferul protonilor de la NADH sau NADPH la diferiți acceptori. În particular, regenerarea NAD(P)$^+$ are loc în catena respiratorie, etapa finală a oxidării biologice. Constituenții acesteia prezintă solubilitate diferită în lipidele membranare, fiind posibilă izolarea unor complecși lipoproteici ce conțin o parte din acești transportori. Prin tratarea mitocondriilor din inimă de bou cu alcool amilic sau cu deoxicolat, *Green* a izolat patru asemenea complecși, notați I, II, III și IV. Dintre aceștia, complexul I conține ***NADH-dehidrogenaza*** (***NADH:ubichinonă-oxidoreductaza***, EC 1.6.5.3), complexul II conține ***succinat-dehidrogenaza*** (***succinat : acceptor-oxido-reductaza***, EC 1.3.99.1) și citocromul b, complexul III conține ***coenzima Q-citocrom c - reductaza (ubichinon:fericitocrom c-oxidoreductaza,*** EC 1.10.2.2), citocromii b și c_1 și coenzima Q, iar complexul IV este ***citocrom c-oxidaza (ferocitocrom c : oxigen-oxidoreductaza,*** EC 1.9.3.1). Toți complecși

lipoproteici conţin 20-30 % lipide, iar în primii trei se găsesc şi proteine ce conţin fier neheminic (Fe-S-proteine şi S-proteine).

Flavoproteinele joacă un rol major în funcţionarea lanţului respirator stând la baza procesului de reglare a utilizării energiei. Ele controlează utilizarea energiei tuturor substratelor de origine glucidică şi proteică care se degradează prin ciclul acizilor tricarboxilici sub acţiunea dehidrogenazelor NAD^+– dependente şi intră în catena respiratorie la nivelul complexului I. Procesul prin care se realizează dehidrogenarea acetil-CoA necesită intervenţia succesivă a trei complecşi enzimatici: ***acil – CoA - dehidrogenaza, flavoproteina transportoare de electroni*** (*electron transferring flavoprotein - ETF*) şi respectiv ***dehidrogenaza flavoproteinei transportoare de electroni*** (*electron transferring flavoprotein dehydrogenase - ETF-DH*). Toate aceste enzime utilizează FAD-ul sau $FADH_2$-ul în calitate de cofactor. Integrarea în catena respiratorie are loc, ca şi în cazul succinatului, la nivelul coenzimei Q (complex III).

Din aceeaşi grupă de flavoproteine face parte şi ***diaforaza (dihidrolipoamid:NAD^+-oxidoreductaza***, EC 1.8.1.4) enzimă ce catalizează dehidrogenarea acidului lipoic formă redusă (–SH) ce trece în forma sa oxidată (–S–S–). Această enzimă este o componentă a complexului multienzimatic al piruvatdehidrogenazei (vezi cap. III.2), precum şi a complexului α-cetoglutaratdehidrogenazic şi conţine FAD-ul în calitate de cofactor.

*d) **Alte flavoenzime*** se întâlnesc la microorganisme, unde îndeplinesc funcţii specifice. În această subgrupă mai pot fi incluse şi flavoenzimele implicate în catabolismul acizilor graşi. În degradarea acestora prin β-oxidare intervine complexul enzimatic al acil-CoA-dehidrogenazei al cărui mecanism de acţiune include şi o etapă FAD-dependentă (fig. 61).

S-a demonstrat că există trei acil-CoA-dehidrogenaze mitocondriale specifice faţă de mărimea catenei hidrocarbonate a restului acil: ***acil-CoA-dehidrogenaza "de catenă lungă"*** ce acţionează asupra resturilor acil C_{12}-C_{18}, ***acil-CoA-dehidrogenaza "de catenă medie"*** specifică acizilor graşi C_6-C_{14} şi respectiv ***acil-CoA-dehidrogenaza "de catenă scurtă"*** sau ***butiril-CoA-dehidrogenaza*** care oxidează acizii graşi C_4-C_6. Toate aceste sisteme enzimatice sunt intramitocondriale.

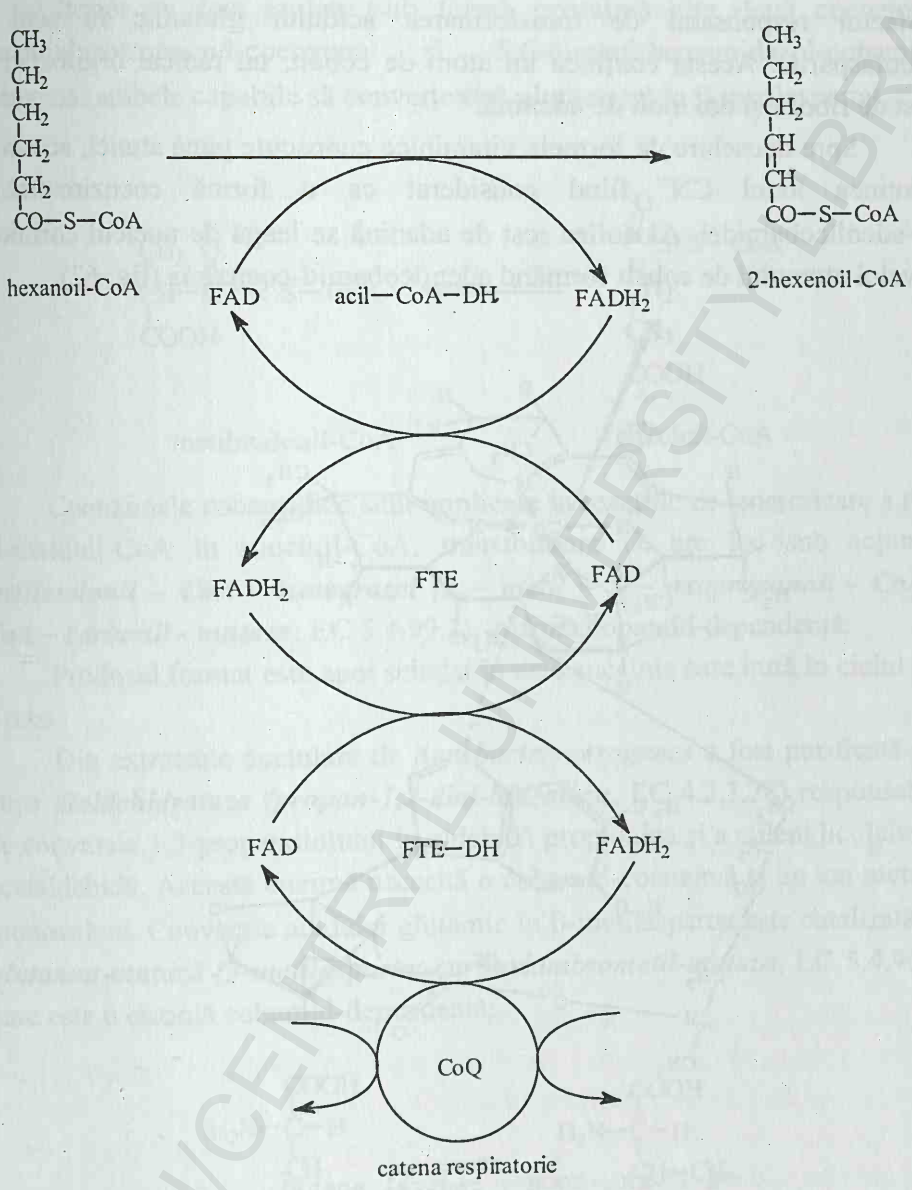


Fig. 61. Implicarea flavoenzimelor în β-oxidarea acizilor graşi

III.5.5 Coenzimele cobamidice

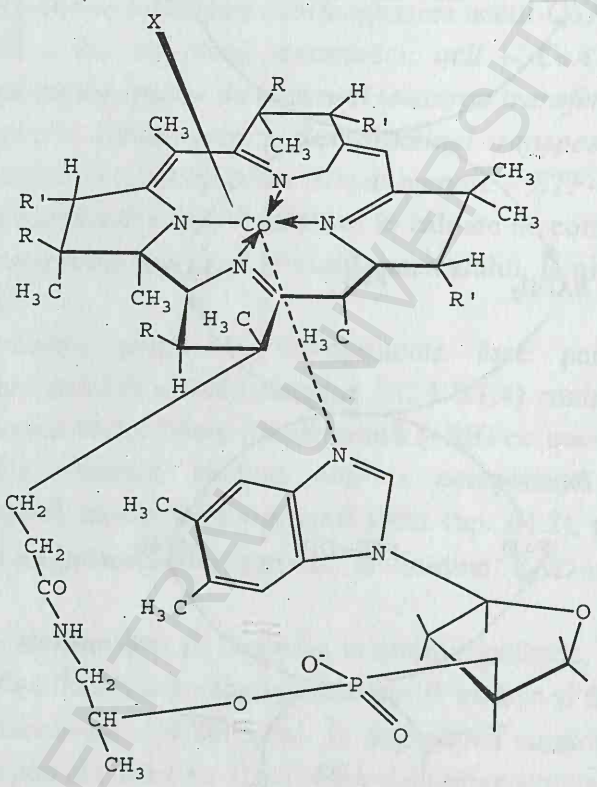
Rolul coenzimatic al vitaminelor B_{12} a fost confirmat pentru prima dată în 1958 prin cercetările efectuate de *Barker et al.* Doi ani mai târziu, aceiaşi autori izolează din extractele acelulare de *Clostridium tetanomorphum* un

B.C.U. „M. EMINESCU" IAŞI
BIOLOGIE

BCU IAŞI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

cofactor responsabil de transformarea acidului glutamic în acid β-metilaspartic. Acesta conținea un atom de cobalt, un radical ortofosfat, un rest de riboză şi doi moli de adenină.

Spre deosebire de formele vitaminice cunoscute până atunci, acesta nu conținea ionul CN^- fiind considerat ca o formă coenzimatică a α–adenilcobamidei. Al doilea rest de adenină se leagă de nucleul corinic la nivelul atomului de cobalt formând adenilcobamid-coenzima (fig. 62).



R : -CH 2-COOH ; radical acetil

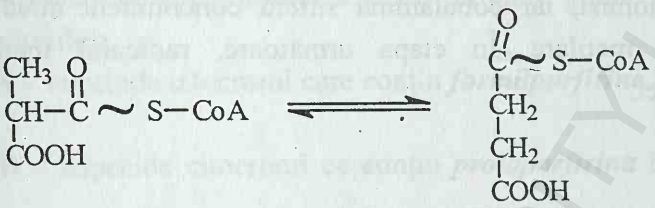
R': -CH 2-CH2-COOH ; radical propionil

Fig. 62. Structura chimică a vitaminei B_{12}

X: -CN — ciancobalamină
: -OH — hidroxicobalamină
: -CH_3 — metilcobalamină
: -adenozil — adenozilcobalamină

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Ulterior au fost izolate sub formă cristalină alte două coenzime: benzimidazolcobamid-coenzima şi 5,6-dimetil-benzimidazol-cobamid-coenzima, ambele capabile să convertească glutamatul în β-metilaspartat.

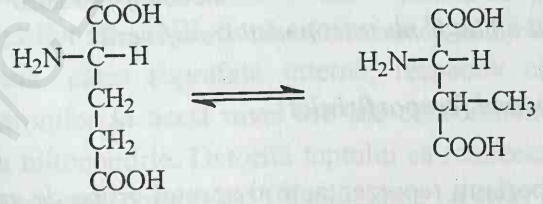


metilmalonil-CoA succinil-CoA

Coenzimele cobamidice sunt implicate în reacţiile de izomerizare a metil-malonil-CoA în succinil-CoA, transformare ce are loc sub acţiunea ***metilmalonil – CoA - izomerazei (2 – metil – 3 – oxopropanoil - CoA : CoA – carbonil - mutaza***, EC 5.4.99.2), enzimă cobamid-dependentă:

Produsul format este apoi scindat în acid succinic care intră în ciclul Krebs.

Din extractele acelulare de *Aerobacter aerogenes* a fost purificată enzima ***dioldehidrataza (propan-1,2-diol-hidrolaza***, EC 4.2.1.28) responsabilă de conversia 1,2-propandiolului în aldehidă propionică şi a etilenglicolului în acetaldehidă. Această enzimă necesită o cobamid-coenzimă şi un ion metalic monovalent. Conversia acidului glutamic în β-metilaspartat este catalizată de ***glutamat-mutază (3-metilaspartat-carboxiaminometil-mutaza***, EC 5.4.99.1) care este o enzimă cobamid-dependentă:



L-glutamat L-β-metil-aspartat

Metilarea homocisteinei în metionină este catalizată de către enzima numită ***metionin-sintază (5-metiltetrahidrofolat:L-homocisteină-metil-***

transferază, EC 2.1.1.13) care este o enzimă cobamid- şi folat-dependentă (fig. 63).

În această reacție, rolul cobalaminei constă în acceptarea radicalului metil cu formare de metil-cobalamină. Donorul acestei grupări este S-adenozilmetionina, iar cobalamina suferă concomitent două transformări: reducere şi metilare. În etapa următoare, radicalul metil este cedat homocisteinei.

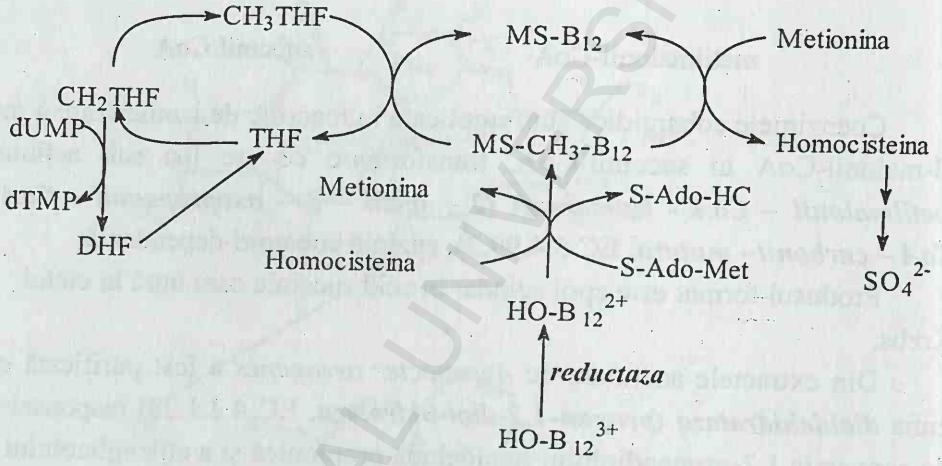


Fig. 63. Mecanismul reacției de metilare a homocisteinei: CH_3THF - metiltetrahidrofolat; CH_2THF - metilentetrahidrofolat; THF - acid tetrahidrofolic; DHF - acid dihidrofolic; S-Ado-Met -S-adenozil-metionină; S-Ado-HC - S-adenozil-homocisteină;$HO\text{-}B_{12}$ - hidroxicobalamină; MS - metionin-sintetază (sau 5-metil-tetrahidrofolat-homocistein-metil-transferază

III.5.6 Cofactori feroporfirinici

Cei mai importanți reprezentanți ai acestei grupe de enzime sunt ***catalazele, peroxidazele*** şi ***citocromii***, care conțin cofactori de natură feroporfirinică.

Citocromii sunt hemoproteine cu rol determinant în procesul respirației celulare care se deosebesc între ei după spectrele de absorbție, afinitatea față de oxigen şi natura chimică a cofactorului. Componenții sistemului

citocromic au spectre caracteristice în domeniul vizibil, iar în funcție de dispoziția benzilor în spectre au fost diferențiați inițial citocromii a, b și c. Mai târziu au fost descoperiți și alți citocromi, fiind necesară utilizarea indicilor (a_1, a_2, b_1, b_2 etc.). În prezent se cunosc peste 20 de citocromi care au fost clasificați de ***Comisia de Enzimologie*** a ***U.I.B.*** în patru grupe, în funcție de structura cofactorului:

grupa A – cuprinde citocromi care conțin ***formilporfirina*** în calitate de cofactor;

grupa B – cuprinde citocromi ce conțin ***protoporfirina*** în calitate de cofactor;

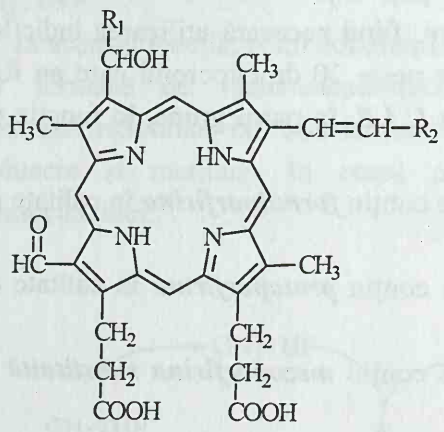
grupa C – cuprinde citocromi ce conțin ***mezoporfirina substituită*** în calitate de cofactor;

grupa D – cuprinde citocromi ce conțin ***dihidroporfirina*** drept cofactor (fig. 64).

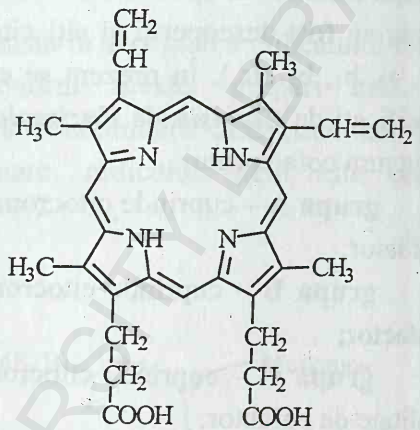
Mai bine studiați sunt citocromii mitocondriali implicați în procesul fosforilării oxidative: b, c, c_1, a și a_3. De un interes aparte s-a bucurat studiul citocromilor b și c_1 ai lanțului respirator mitocondrial. Ei formează așa-numitul complex III care funcționează ca o ***ubichinon – citocrom c reductază***, ceea ce înseamnă că rolul acestui complex constă în transportul electronilor de la coenzima Q la citocrom-oxidază (cit. a + a_3).

Complexul III conține zece subunități diferite din punctul de vedere al mobilității electroforetice în gel de poliacrilamidă – dodecilsulfat de sodiu. Dintre acestea, subunitatea III joacă un rol esențial și conține două nuclee heminice suprapuse, incluse în membrană (fig. 65).

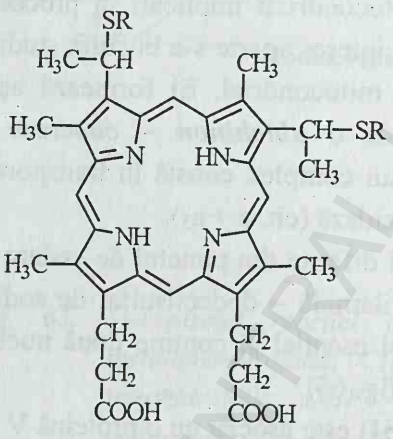
Citocromul c_1 (notat cu IV în figura 64) este asociat cu o proteină V cu fier și sulf cunoscută sub numele de ***proteina Rieske***. Complexul bc_1 conține, la nivelul subunităților III și VII, două situsuri de legare a ubichinonei localizate în membrană, către suprafața internă, respectiv către cea externă. Transportul electronilor la acest nivel are loc concomitent cu expulzarea a patru protoni din mitocondrie. Datorită faptului că realizează restabilirea potențialului de membrană, complexul III reprezintă un situs de cuplare cu sinteza de ATP.



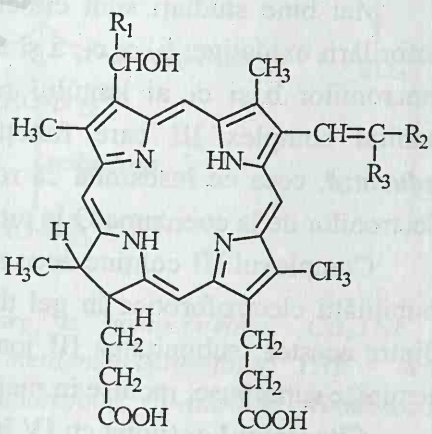
I



II



III



IV

Fig.64. Cofactorii unor citocromi: I - formilporfirina; II -protoporfirina; III - mezoporfirina; IV - dihidroporfirina

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

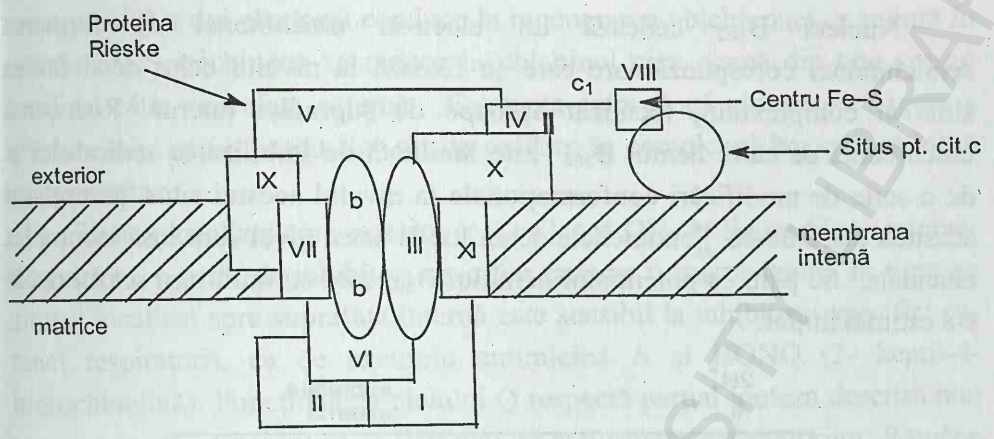


Fig. 65. Reprezentarea schematică a structurii complexului bc_1 (Brandt, U. – 1993)

În catena respiratorie, ubichinona (Q) este redusă la ubichinol (QH_2). Se admite că acest proces constă în eliminarea a doi protoni la suprafața internă a membranei. Procesul invers, de reoxidare a ubichinolului în ubichinonă determină expulzarea a doi protoni la suprafața externă a membranei. În felul acesta, fiecare ciclu de oxido-reducere a ubichinonei determină translocarea a doi protoni din interior către exterior. Funcționarea complexului bc_1 dublează acest bilanț, realizând așa-numitul ***ciclu Q*** (*Mitchel, P. et al. – 1976* (fig. 66).

În schema reprezentată în figura 66, prin + sunt desemnate cele două nuclee heminice suprapuse ale subunității III (b_{566} și b_{562}). Complexul conține în permanență o moleculă de ubichinonă sub formă redusă (QH_2) sau sub forma radicalului semichinonic (Q*).

În situația reprezentată în figura 66 A, forma redusă a ubichinonei (QH_2) legată de situsul localizat spre suprafața externă, cedează citocromului c_1 un electron prin intermediul situsului Fe – S al proteinei Rieske. Potențialul electrochimic standard al cuplului Q^*/QH_2 este de +190 mV, iar al cuplului Q/Q* de – 30 mV, în timp ce potențialul proteinei Rieske este mul mai mare (+280mV), ceea ce înseamnă că este favorizată reducerea sa de către ubichinol (*Trumpoweer, B.I.* – 1986) cu expulzarea a doi protoni. Semichinona reduce cele două nuclee heminice, mai întâi nucleul B_{566} care are un potențial scăzut (– 100 mV), apoi nucleul B_{562} al cărui potențial este de + 250 mV.

Nucleul B_{562} cedează un electron ubichinonei cu formarea semichinonei corespunzătoare care se fixează la nivelul celui de-al doilea situs al complexului, localizat aproape de suprafața internă. Reducerea ubichinonei de către hemul B_{562} este facilitată de stabilizarea radicalului și de o serie de modificări conformaționale la nivelul acestui situs, potențialul acestuia mărindu-se. Fenomenele ce au loc la acest nivel sunt însă incomplet elucidate. Se pare că potențialul hemului B_{562} este cu mult mai scăzut decât s-a estimat inițial.

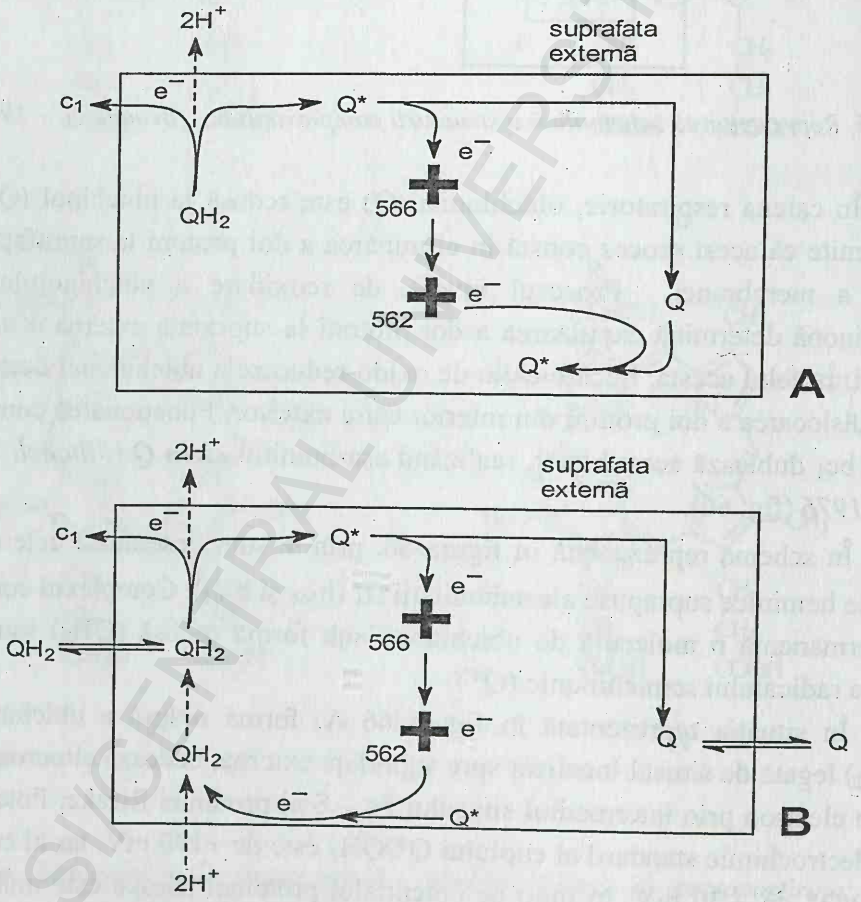


Fig. 66. Rolul ubichinonei în transportul transmembranar de protoni (Mitchel, P. – 1976)

Fenomenele reprezentate schematic în figura 66 B constau în reoxidarea ubichinolului ce a fost expulzat în exterior. De această dată, ceda-

rea succesivă a doi electroni conduce la regenerarea ubichinonei ce reintră în membrană. Semichinona se reduce la ubichinol care ocupă din nou situsul localizat către suprafața externă. Existența celor două situsuri de legare a ubichinolului sau a produşilor săi de oxidare în complexul bc_1 este stabilită cu certitudine.

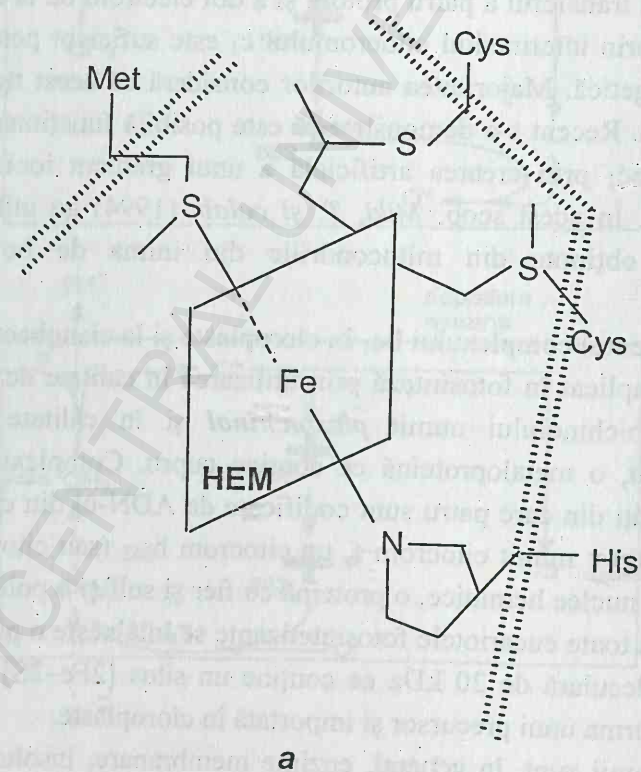
Situsul localizat spre exterior (cel ce leagă QH_2 în figura 66 A) interacționează cu o serie de inhibitori specifici cum ar fi mixotiazolul, în timp ce situsul localizat spre suprafața internă este sensibil la inhibitorii specifici catenei respiratorii, ca de exemplu antimicina A şi HQNO (2- heptil-4-hidrochinolină). Funcționarea ciclului Q respectă parțial ipoteza descrisă mai sus, aceasta fiind acceptată în linii mai de majoritatea cercetătorilor. Rămâne controversat însă aspectul energetic al acestor procese. Mai exact, se pune problema dacă transferul a patru protoni şi a doi electroni de la ubichinonă la citocromul c prin intermediul citocromului c_1 este suficient pentru a explica cuplarea energetică. Majoritatea autorilor consideră că acest transport joacă un rol esențial. Recent s-a demonstrat că este posibilă funcționarea inversă a complexului bc_1 prin crearea artificială a unui gradient ionic cu ajutorul valinomicinei. În acest scop, *Miki, T. şi colab.* (1994) au utilizat vezicule membranare obținute din mitocondriile din inima de bou tratate cu valinomicină.

Echivalentul complexului bc_1 în cloroplaste şi la cianobacterii este citocromul b_6f implicat în fotosinteză prin utilizarea în calitate de donor a unui derivat al ubichinolului numit ***plastochinol*** şi în calitate de acceptor ***plastochinona***, o metaloproteină ce conține cupru. Complexul b_6f conține cinci subunități din care patru sunt codificate de ADN-ul din cloroplaste: un citocrom de tip c numit citocrom f, un citocrom b_{563} (sau citocromul b_6) ce conține două nuclee heminice, o proteină cu fier şi sulf şi o polipeptidă cu rol structural. La toate eucariotele fotosintetizante se întâlneşte o proteină Rieske cu masa moleculară de 20 kDa ce conține un situs [2Fe–2S] sintetizată în citosol sub forma unui precursor şi importată în cloroplaste.

Citocromii sunt, în general, enzime membranare, insolubile. Excepție face ***citocromul c*** mitocondrial care este solubil, putând fi uşor extras şi purificat. Având un pronunțat caracter cationic, citocromul c aderă prin interacțiuni electrostatice la suprafața externă a membranei interne mitocondriale. Primele studii asupra citocromului c s-au făcut prin compararea structurii chimice (a secvențelor de aminoacizi) ale apoenzimelor citocromilor c din

drojdii şi respectiv din ţesuturile vegetale şi animale. S-a constatat astfel că majoritatea citocromilor c sunt proteine cu mase moleculare relativ mici (11 – 14 kDa) şi au o organizare structurală comună, întâlnită şi la citocromul c_{551} din *Pseudomonas*, citocromul c_2 întâlnit la bacteriile fotosintetizante şi citocromul f din cloroplaste.

În cazul citocromului c mitocondrial, legarea nucleului heminic de apoenzimă se face covalent, la nivelul a două resturi de cisteină prin intermediul resturilor sale vinilice, iar atomul de fier din structura nucleului tetrapirolic formează a 5-a şi a 6-a coordinare cu un rest de histidină, respectiv un rest de metionină din structura apoenzimei. La alţi citocromi c, legarea fierului se poate face diferit, de exemplu la nivelul a două resturi de histidină (fig. 67).



a

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITARA LIBRARY

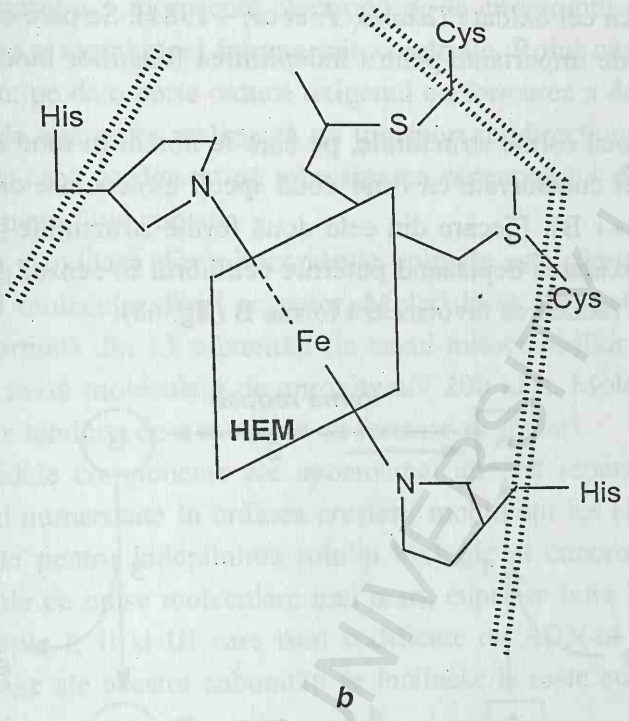


Fig. 67. Reprezentarea schematică a coordinării fierului heminic în citocromul c mitocondrial (a) şi alţi citocromi c (b) (Breyton, C. et al. – 1994)

Componenta proteică conţine alte două resturi de aminoacizi între cele două resturi de cisteină ce leagă hemul, iar restul de histidină ce coordinează fierul este situat în imediata vecinătate a unuia din cele două resturi de cisteină (*Vitry, C.* – 1994). Ionul de fier este înglobat în structura hemului dar nu poate fi redus decât de un electron cedat de complexul III (citocromul bc_1) sau de unii agenţi reducători specifici cum ar fi acidul ascorbic şi se poate reoxida sub acţiunea citocrom-oxidazei (cit. $a + a_3$).

Transferul de electroni are loc deci în ambele sensuri, între suprafaţa moleculei şi ionul de fier prin intermediul catenelor laterale ale resturilor de aminoacizi, mai exact prin intermediul sulfului din restul de metionină ce leagă fierul.

Reducerea fierului din molecula citocromului c este însoţită de o modificare conformaţională a moleculei cu unele repercusiuni asupra proprietăţilor sale. De exemplu, citocromul c redus nu mai cristalizează în aceleaşi forme

geometrice ca cel oxidat (*Takano, T. et al.* – 1981). Se pare că aceste procese sunt extrem de importante pentru îndeplinirea funcțiilor biochimice ale citocromului c.

Cele două forme structurale, pe care le notăm în mod convențional cu A şi B, pot fi considerate ca fiind două specii moleculare distincte aflate la echilibru (A ↔ B). Fiecare din cele două forme structurale poate fi oxidată sau redusă, oxidarea deplasând puternic echilibrul în sensul generării formei A, în timp ce reducerea favorizează forma B (fig. 68).

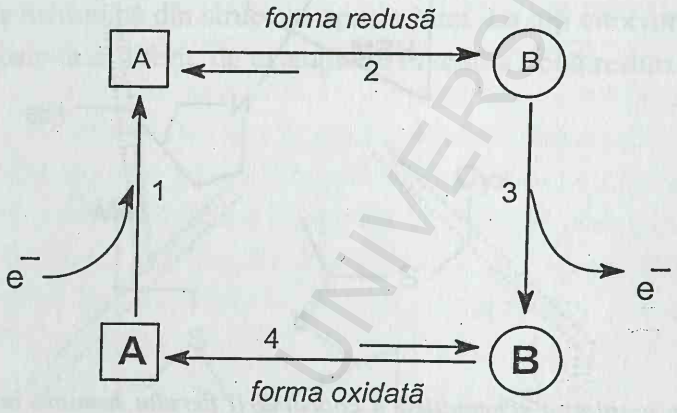


Fig. 68. Modificările structurale ale citocromului c în procesele de oxido-reducere (Takano, T. et al. – 1981)

Fiecare din cele două forme structurale A şi B poate exista atât în forma oxidată cât şi redusă, iar potențialul standard de oxido-reducere al formei A nu este în mod obligatoriu egal cu cel al formei B. Să presupunem că forma B a citocromului c în stare redusă posedă un potențial mai scăzut. În aceste condiții forma B se comportă ca un bun agent reducător, în timp ce forma A este un bun agent oxidant. Aceasta înseamnă că transformările reprezentate în diagrama din figura 68 decurg în sensul acelor de ceasornic.

Realizarea completă a ciclului constă în transferul unui electron de la un donor la un acceptor prin intermediul citocromului c. Etapele a 2-a şi a 4-a ale ciclului corespund unor modificări conformaționale ale moleculei şi se compensează reciproc din punct de vedere energetic.

Ultima verigă a catenei respiratorii la toate organismele superioare o constituie complexul mitocondrial $a + a_3$ sau ***citocrom c oxidaza*** (EC

1.9.3.1). Citocromul a + a_3 acceptă electronii de la citocromul c localizat la suprafața externă a membranei interne mitocondriale. Rolul citocrom c oxidazei este dublu: pe de o parte reduce oxigenul cu formarea a două molecule de apă, iar pe de altă parte realizează un transport unidirecțional de protoni prin membrană, ceea ce determină reîncărcarea potențialului de membrană, cele două fenomene fiind cuplate.

Citocrom c oxidaza din mitocondriile animale este o enzimă ce utilizează oxigenul molecular drept acceptor. Molecula sa are o structură complexă şi este formată din 13 subunități (în cazul mitocondriilor din inima de bou), având o masă moleculară de aproximativ 200 kDa. Molecula citocromului a + a_3 are tendința de a se asocia cu formare de dimeri.

Polipeptidele componente ale apoenzimei au fost separate prin electroforeză, fiind numerotate în ordinea creşterii mobilității lor electroforetice. Mai importante pentru îndeplinirea rolului biologic al citocromului a + a_3 sunt subunitățile cu mase moleculare mai mari, cuprinse între 26 şi 56 kDa, adică subunitățile I, II şi III care sunt codificate de ADN-ul mitocondrial. Forme omoloage ale acestor subunități se întâlnesc la toate eucariotele şi la bacteriile aerobe.

Celelalte subunități au mase moleculare mai mici de 20 kDa şi sunt codificate de ADN-ul nuclear, numărul lor fiind mai mic la organismele inferioare. De exemplu, la enzima din drojdia de bere se întâlnesc opt asemenea subunități, iar la mazăre doar cinci, în timp ce citocrom c oxidazele din *Paracoccus denitrificans* şi *Rhodobacter sphaeroides* nu conțin nici o subunitate mică, fiind alcătuite doar din cele trei subunități fundamentale (*Hossler, J.P. et al.* – 1992).

Citocrom c oxidazele fac parte dintr-o grupă importantă de oxidoreductaze respiratorii ce utilizează oxigenul drept acceptor, în timp ce donorul poate fi citocromul c sau ubichinona redusă (QH_2), ceea ce înseamnă că există de fapt o ***citocrom c oxidază propriu-zisă*** şi o ***chinol oxidază*** care au în comun unele caracteristici structurale, conținând atât fier heminic cât şi cupru (fig. 69). Schema din figură nu reprezintă şi subunitatea III, aceasta putând fi uşor pierdută în timpul purificării (*Berry, E.A. et al.* – 1985).

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

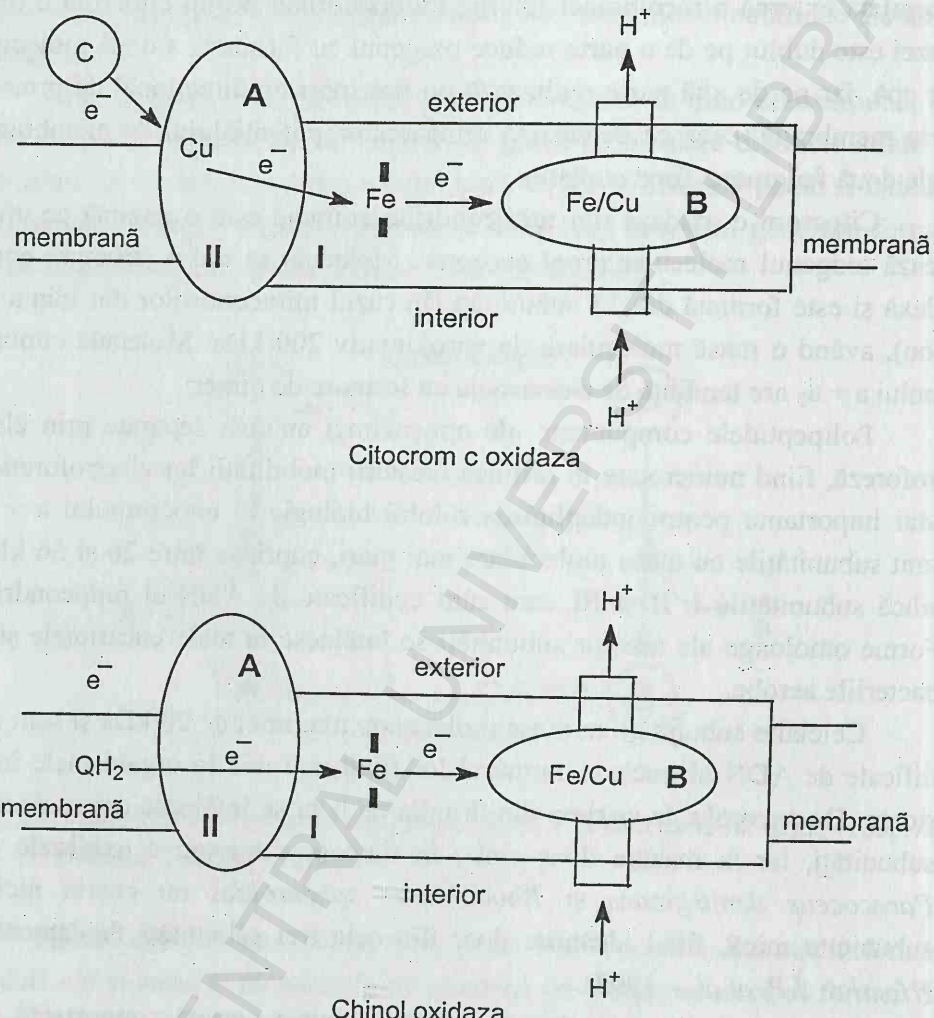


Fig. 69. Reprezentarea schematică a funcționării etapei finale a catenei respiratorii (Berry, E.A. et al. – 1985). ***Citocrom c oxidaza*** *(cit. a + a_3 de la mamifere, drojdii, P.denitrificans, Rh. Sphaeroideus etc. sau cit. b + a_3 de la Thermus thermophylus);* ***Chinol oxidaza*** *(cit. b + a_3 de la E. Coli sau cit. a + a_3 de la Bacillus subtilis)*

Subunitățile I și II conțin toți cofactorii necesari transportului de electroni și protoni. S-a demonstrat de altfel că citocrom c oxidaza din *Paracoccus denitrificans* poate funcționa și în absența subunității III. Subuni-

BCU MICROCENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

tatea I conține două nuclee heminice localizate către suprafața externă a membranei (fig. 70).

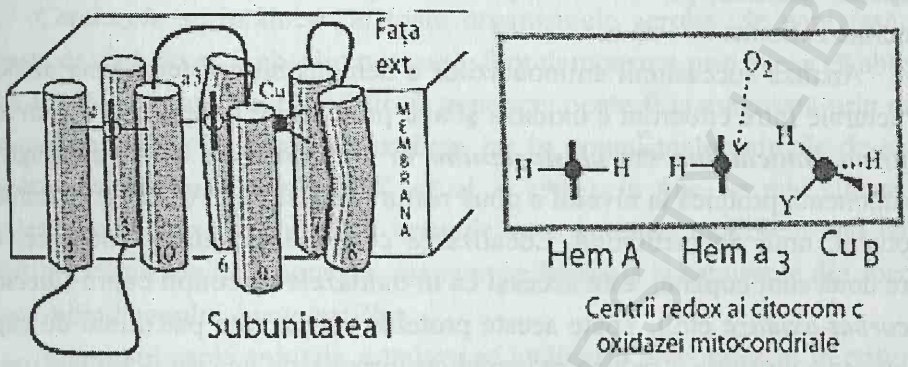


Fig. 70. Reprezentarea schematică a localizării membranare a citocrom c oxidazei microbiene (Berry, E. A. et al. – 1985)

Primul dintre ele este hemul A sau B, iar al doilea este hemul A sau O. Oxidaza mitocondrială este de tip a + a_3, iar cea din *E. coli* de tip b + o_3. În aceste denumiri, cifra 3 indică în mod convențional faptul că hemul citocromului respectiv participă direct la reducerea O_2. Ionul de cupru este stîns legat de cea de-a doua grupare heminică, fiind notat de regulă Cu_B. Complexul hem – Cu_B are proprietăți diamagnetice și este direct implicat în reducerea oxigenului. El primește o pereche de electroni de la primul hem care este, de asemenea, paramagnetic (*Berry, E.A. et al.* – 1985). Secvența de aminoacizi din subunitatea I s-a conservat mai puțin în familia oxidazelor și conține 12 fragmente α-helicoidale transmembranare (*Raitio, M et al.* – 1987) (în schema din figura 70 sunt reprezentate doar șapte astfel de segmente și anume cele ce includ situsurile redox). Nucleele heminice sunt legate de resturile de histidină (notate cu H în figură), iar cuprul de trei resturi de histidină și unul de tirozină (notat cu Y).

Subunitatea II este cea care determină tipul donorului de electroni. În cazul mitocondriilor din țesuturile animale, unde donorul de electroni este citocromul c, subunitatea II conține cuprul notat Cu_A, acest centru metalic fiind reprezentat de doi ioni de cupru Cu^{2+} – Cu^{+} (*Wachenfeldt, C. et al.* – 1994). Acest situs metalic este absent în chinol-oxidaza din *E. coli* care, în schimb, conține un situs de legare a ubichinonei (*Ingledew, W.J. et al.* –

1995). Se pare că subunitatea II este esențială pentru legarea citocromului c datorită existenței a două sarcini negative ale resturilor de acid aspartic și respectiv glutamic pe care le conține, în timp ce citocromul c are un caracter puternic cationic.

Analiza succesiunii aminoacizilor a demonstrat existența unei analogii structurale între citocrom c oxidază și alte proteine ce conțin cupru cum ar fi ***azurina, amicianina*** sau ***plastocianina*** în care ionul de cupru se leagă de componenta proteică la nivelul a două resturi de histidină, două de cisteină și, probabil, unul de metionină. Localizarea celor patru situsuri metalice, din care două sunt cuplate, este aceeași ca în oxidazele ce conțin cupru (***laccaza, ascorbat-oxidaza*** etc.). Toate aceste proteine conțin câte patru ioni de cupru și au capacitatea de a reduce oxigenul cu formare de apă după același mecanism ca și citocrom c oxidaza.

În urma unor experimente bazate pe spectrometria de masă și mutageneza dirijată s-a confirmat faptul că situsul Cu_A din citocrom c oxidază conține doi ioni de cupru (*Kelly, M. et al.* – 1995). Aceasta înseamnă că situsul metalic este mai complicat decât cel din cromoproteinele menționate mai sus, dar este foarte asemănător cu cel întâlnit la o reductază din *Pseudomonas stutzeri* ce oxidează N_2O.

În grupa oxidoreductazelor ce conțin cofactori feroporfirinici este inclusă și ***catalaza*** (H_2O_2:H_2O_2-***oxidoreductaza***, EC 1.11.1.6), enzimă ce catalizează reacția de descompunere a apei oxigenate:

$$2\,H_2O_2 \xrightarrow[catalaza]{} 2\,H_2O + O_2$$

În mod similar, **peroxidaza** (**donor:H_2O_2-oxidoreductaza**, EC 1.11.1.7) catalizează reacția de oxidoreducere bimoleculară în care H_2O_2 acceptă protoni de la un donor, altul decât H_2O_2:

$$D + 2\,H_2O \xrightarrow[peroxidaza]{} DH_2 + H_2O_2$$

Majoritatea catalazelor au moleculele alcătuite din câte patru subunități identice cu masele moleculare de câte 250 kDa. Fiecare subunitate conține câte un ion de Fe^{3+} înglobat în nucleul heminic în mod similar cu cel din he-

moglobină, deşi există şi unele excepţii. Astfel, a fost semnalată existenţa la *Thermus thermophilus* a unei catalaze neheminice ce conţine magneziu şi are o structură sub formă de hexamer (*Barynin, V. et al.* – 1986).

Catalazele se întâlnesc în toate organismele aerobe. Se pare însă că această enzimă nu ar fi absolut necesară, fapt demonstrat prin aceea că absenţa sa totală, datorată unor modificări genetice, poate fi compensată prin descompunerea H_2O_2 de către ***peroxidaze***, iar în organismele animale de către ***glutation-peroxidază*** (*Tanaka, K. et al.* – 1994). În fine, se mai cunosc şi catalaze atipice în care nucleul heminic este puternic modificat sau chiar substituit cu un ion de magneziu, aşa cum se întîmplă la catalazele din speciile aparţinînd genului *Lactobacillus*.

La organismele animale, catalaza se întâlneşte preponderent în eritrocite, măduva osoasă, ficat, rinichi şi piele, fiind localizată în citoplasmă şi mitocondrii. În unele ţesuturi (ca de exemplu ţesutul hepatic) celulele conţin microcorpusculi citoplasmatici delimitaţi printr-o membrană simplă numiţi ***peroxisomi***, termen propus de către *de Duve* în 1965. Pe lângă catalază, peroxisomii mai conţin şi numeroase oxidaze: ***aminoacid-oxidaze, urat-oxidaza, acil-CoA-oxidaza*** etc., adică enzime ce produc apă oxigenată şi enzime care o descompun (fig. 71).

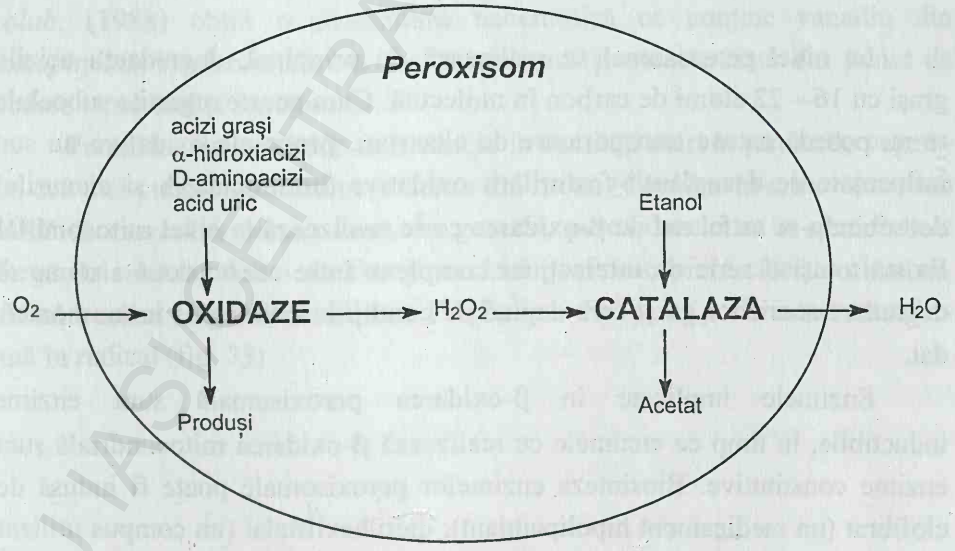


Fig. 71. Reprezentarea schematică a producerii şi descompunerii H_2O_2 în peroxisomi (Greenberg, J.T. et al. – 1991)

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Peroxisomii se întâlnesc doar în celulele eucariote. La plantele superioare ei au fost numiți ***glioxisomi*** deoarece mai conțin și echipamentul enzimatic ce realizează ciclul glioxilatului. Peroxisomii pot realiza o β-oxidare a acizilor grași printr-un mecanism diferit de cel din mitocondrii (fig. 72).

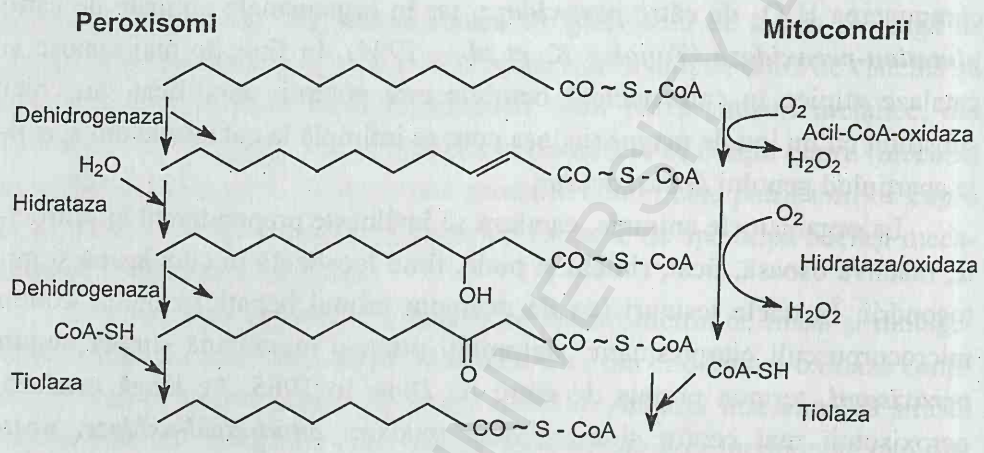


Fig. 72. Degradarea acizilor grași prin β-oxidare în peroxisomi și mitocondrii (Pelmont, J. – 1995)

La nivel peroxisomal se realizează, în principal, degradarea acizilor grași cu 16 – 22 atomi de carbon în moleculă. Cum aceste organite subcelulare nu posedă catene transportoare de electroni, procesele oxidative nu sunt influențate de decuplanții fosforilării oxidative (antimicina A și cianurile), deosebindu-se astfel net de β-oxidarea ce se realizează la nivel mitocondrial. Există totuși o serie de interacțiuni complexe între aceste două sisteme de degradare a acizilor grași care depind de condițiile fiziologice la un moment dat.

Enzimele implicate în β-oxidarea peroxisomală sunt enzime inductibile, în timp ce enzimele ce realizează β-oxidarea mitocondrială sunt enzime constitutive. Biosinteza enzimelor peroxisomale poate fi indusă de clofibrat (un medicament hipolipemiant), dietilhexilftalat (un compus utilizat în industria maselor plastice), aspirină, acizi grași cu catenă mare, regim alimentar bogat în grăsimi etc.

BCU "CAROL I" UNIVERSITY LIBRARY

Celulele de *E. coli* conțin două catalaze diferite care au fost denumite ***hidroperoxidaza I*** (***HP I***) și respectiv ***hidroperoxidaza II*** (***HP II***). HP I este o catalază atipică ce funcționează atât ca o catalază cât și ca o peroxidază. Molecula sa conține patru subunități a câte 78 kDa fiecare și doar două nuclee heminice. HP II funcționează ca o catalază propriu-zisă deși molecula sa conține șase subunități (a câte 93 kDa fiecare) și nuclee heminice modificate, în timp ce componenta proteică are o succesiune de aminoacizi foarte apropiată de cea a catalazelor de la eucariote (*Ossowski, I. et al.* – 1991).

În general, catalazele sunt considerate ca fiind enzime mai puțin eficiente în neutralizarea H_2O_2, mai ales la concentrații mici de substrat. În schimb ***peroxidaza*** poate descompune apa oxigenată și atunci când aceasta este în concentrații foarte mici.

Unele peroxidaze din țesuturile animale, cum ar fi de exemplu ***glutation-peroxidaza***, reprezintă factori importanți de apărare a organismului față de acțiunea extrem de toxică a peroxizilor. Ca și catalazele, peroxidazele sunt proteine heminice ce conțin Fe^{3+} cu un moment de spin mare. Componenta heminică poate fi extrasă ușor prin tratare cu acetonă în mediu acid și are capacitatea de a forma un complex cu piridina, proprietate ce stă la baza unor metode de identificare a heminei. Dar și în cazul peroxidazelor există unele excepții din punct de vedere structural. Astfel, *Müller-Fahrnow și colab.* (1988) obțin o peroxidază neheminică ce conține vanadiu din *Ascophyllum nodosum* care a fost cristalizată și caracterizată din punct de vedere structural și funcțional.

Peroxidazele heminice se întâlnesc în cantități mari în țesuturile vegetale, cea mai cunoscută fiind peroxidaza din hrean (*Cochlearia armoracia*) sau HRP (*horseradish peroxydase*). În general, peroxidazele au o specificitate largă de substrat. Ionul de fier și nucleul porfirinic pierd câte un electron, fierul trecând la starea de oxidare IV ($Fe^{3+} \rightarrow Fe^{4+}$), iar porfirina se transformă în radical (fig. 73).

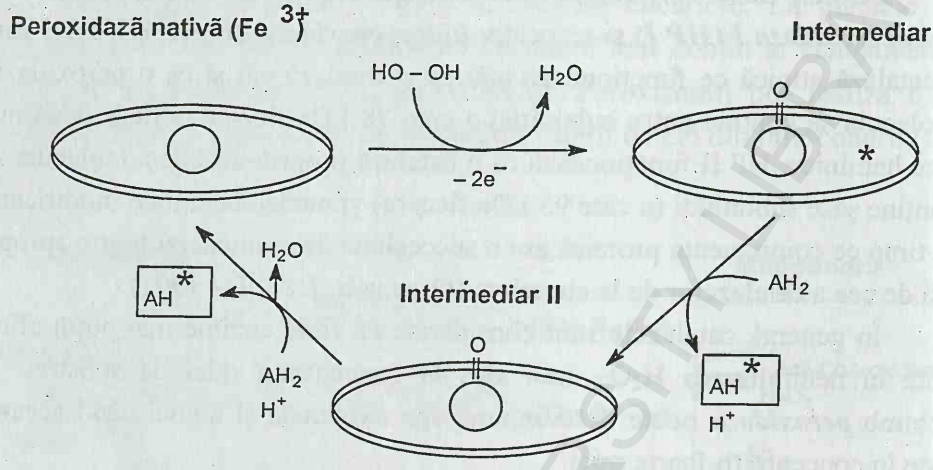


Fig. 73. Reprezentarea schematică a mecanismului de acțiune al peroxidazelor (Farrington, J.A. et al. – 1980)

Nucleul heminic al peroxidazei se leagă de apoenzimă la nivelul unui rest de histidină, spre deosebire de catalază unde legarea se face la nivelul unui rest de tirozină. Diferențele cele mai mari față de catalază constau însă în mecanismul de acțiune. Astfel, regenerarea ionului Fe^{3+} se face succesiv, prin transferul câte unui electron, trecându-se prin starea de oxidare II (Fe^{2+}) când nucleul porfirinic este sub formă de radical. Substratul organic suferă la rândul său un proces de oxidare când cedează un electron, trecând în radicalul AH^*. În acest ciclu de transformări are loc eliminarea succesivă a două molecule de apă și reducerea compusului intermediar I al enzimei în două etape.

Dacă radicalul AH^* format în fiecare din aceste etape prezintă un caracter reducător suficient de puternic, el poate reacționa din nou cu compusul I sau cu compusul II, aceste reacții având loc ca și cum molecula substratului s-ar oxida prin cedarea a doi electroni. Acest fenomen se observă însă doar în unele cazuri particulare. De exemplu, NADH-ul este oxidat de către compusul I cu formarea radicalului NADH* care se comportă ca un agent reducător puternic, capabil să reducă din nou compusul I sau chiar să reducă ionul de fier heminic din structura enzimei ($Fe^{3+} \rightarrow Fe^{2+}$), fără a fi afectat compusul intermediar II. Se consideră că derivatul intermediar I al peroxidazelor are capacitatea de a oxida substratul cu o viteză de 10 – 100 de ori mai mare de-

cât compusul II. În primul caz, substratul intră în contact cu enzima într-un situs situat într-un areal vecin cu radicalul porfirinic, iar transportul de electroni se realizează foarte rapid (10^9 e/M.s), adică într-un interval de timp mai scurt chiar decât timpul necesar formării complexului enzimă-substrat (*Kobayashi, K. et al.* – 1990). Prezența radicalului porfirinic în compusul I este foarte importantă pentru funcționarea peroxidazelor. Datorită existenței acestui radical enzima poate oxida cu viteză mare substratele cu masă moleculară mică care ajung în vecinătatea nucleului porfirinic. Ca urmare, radicalul este dislocat, ajungându-se chiar până la înlocuirea lui cu un rest de aminoacid vecin (tirozină sau triptofan). În felul acesta, întregul centru activ se comportă ca un radical.

Unele peroxidaze acționează însă asupra unor substrate macromoleculare. Cum nucleul porfirinic este înglobat într-o cavitate apolară a apoenzimei, este exclus ca în aceste situații substratul să se poată lega în întregime la nivelul situsului catalitic. În aceste cazuri, mecanismul de reacție constă într-o succesiune de modificări ale resturilor de aminoacizi, începând cu resturile situate în „miezul" enzimei şi apoi cele de la suprafață. Acest mecanism este caracteristic, de exemplu, ***lignin-peroxidazei*** şi ***citocrom c peroxidazei***, aceasta din urmă fiind o peroxidază caracteristică drojdiilor.

La mamifere se întâlneşte o peroxidază specială implicată în procesul de biosinteză a hormonilor tiroidieni. Glanda tiroidă conține 20 – 30% din cantitatea totală a iodului din organism aflat sub formă de iodură (I^-). Înainte de a fi înglobat în nucleele benzenice ale resturilor de tirozină din structura tiroglobulinei, anionii de iod sunt aduşi la starea de oxidare +1 (I^+) sub acțiunea acestei peroxidaze.

Tiroglobulina este o glicoproteină a cărei moleculă conține două subunități identice a câte 300 kDa fiecare la care sunt ataşate numeroase catene oligozaharidice. Tiroglobulina conține câțiva radicali carboximetil şi cel puțin nouă grupe sulfat grefate pe resturi de tirozină. Catenele polipeptidice sunt foarte bogate în resturi de tirozină. De exemplu, în cazul tiroglobulinei umane, componenta proteică conține 2748 resturi de aminoacizi din care 65 de resturi de tirozină (*Malthièry, Y. et al.* – 1987).

Biosinteza tiroglobulinei în glanda tiroidă se află sub controlul tirotropinei (TSH), un hormon reglator din hipofiză, procesul biosintetic fiind stimulat la nivelul transcripției. Tirotropina are însă o acțiune multiplă. În afară de reglarea biosintezei tiroglobulinei, TSH mai acționează în sensul

creşterii concentraţiei AMP-ului ciclic, activează excreţia şi endocitoza, stimulează metabolismul glucidic accelerând calea pentozo-fosfaţilor etc.

În procesul biosintezei hormonilor tiroidieni, peroxidaza intervine în două momente diferite. În primul rând oxidează ionii I^- şi înglobează atomii de iod în resturile de tirozină, iar în al doilea rând, peroxidaza realizează o oxidare a tiroglobulinei după secreţia sa. Penultima etapă a procesului biosintetic constă în cuplarea resturilor de tirozină iodurate două câte două, în fragmentele N-terminale ale catenelor polipeptidice ale tiroglobulinei. Acest fenomen se realizează prin apariţia, sub acţiunea peroxidazei, a doi radicali care vor interacţiona apoi cedând proteinei un rest de dehidro-alanină. Hormonul se va elibera astfel din molecula tiroglobulinei care va fi importată în lisosomi (fig. 74)

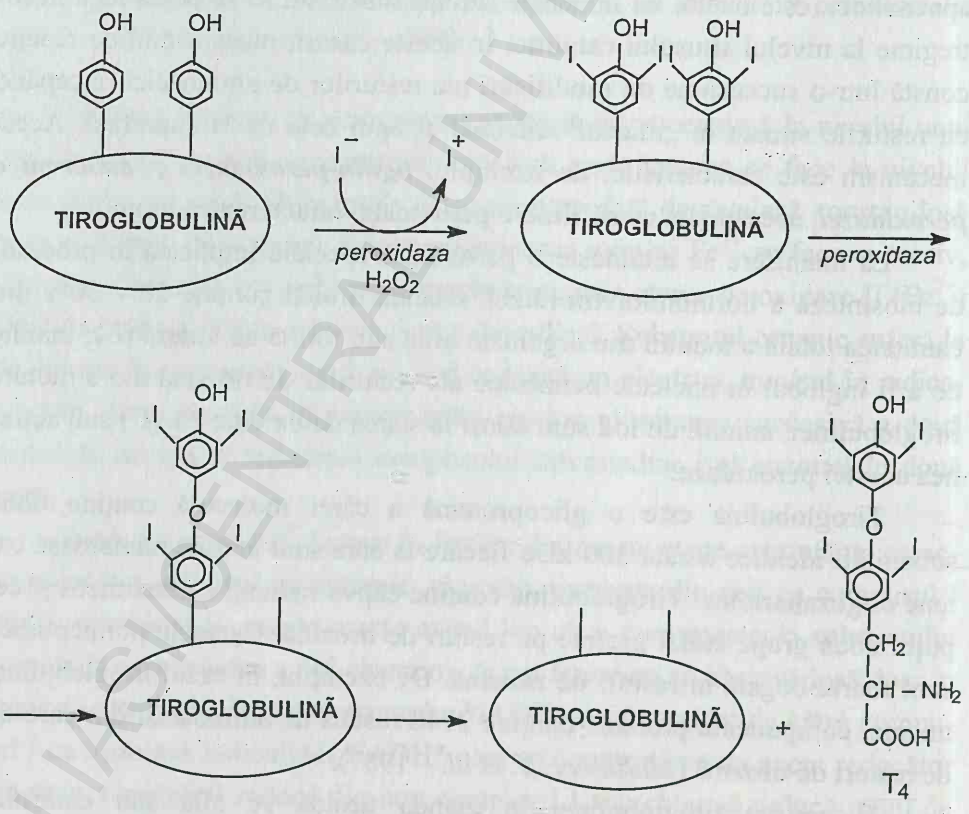


Fig. 74. Implicarea peroxidazei în biosinteza tiroxinei – T_4 (Hartog, M.T. et al. 1995)

BCU IAŞI CENTRALĂ UNIVERSITARĂ

Din numărul total al resturilor de tirozină din structura tiroglobulinei, doar 25 până la 40 pot fi iodurate, iar dintre acestea doar 4 – 16 vor participa la formarea hormonilor tiroidieni. Aceasta înseamnă că peroxidaza nu acționează la întâmplare, procesele oxidative având loc la nivelul unor situsuri localizate într-o ordine bine determinată.

Peroxidaza tiroidiană reprezintă un edificiu macromolecular specific cu o structură complexă şi este o enzimă ce joacă concomitent şi rol de cosubstrat. Capacitatea sa de a forma derivați iodurați ai tirozinei este anulată de acțiunea, chiar şi parțială, a unor agenți denaturanți.

Analiza secvențelor de aminoacizi din fragmentele la nivelul cărora se realizează iodurarea şi respectiv condensarea resturilor de tirozină iodurate a demonstrat existența aşa-numitelor ***domenii hormonogene*** care au rolul de a pune în contact situsul donor cu cel acceptor ce participă la reacția de condensare (*Hartog, M.T. et al.* – 1995).

Domeniul cel mai activ este localizat în zona N-terminală, mai exact în jurul restului Tyr_5, existând însă trei tipuri de domenii repetitive. Dintre acestea, tipul I conține 60 resturi de aminoacizi, iar tipul II 14 – 17 asemenea resturi. Unele domenii sunt mai mari datorită inserției unor secvențe „străine". S-a demonstrat că există unele corelații între punctele de joncțiune dintre exonii şi intronii genei şi aria de întindere a diferitelor domenii (*Vassart, J.P. et al.* – 1987). Domeniile de tip II conțin situsurile de glicozilare (fig. 75).

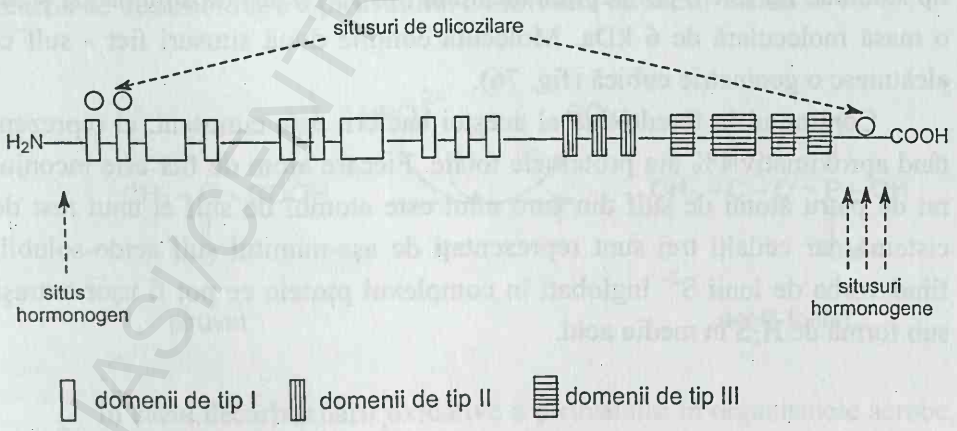


Fig. 75. Omologia internă a tiroglobulinei (Vassart, J.P. et al. – 1987)

Această complexitate structurală demonstrează faptul că în afară de rolul său strict hormonogen, tiroglobulina poate interacționa în mod specific cu diferiți constituenți celulari putând îndeplini și alte funcții.

III.5.7 Feredoxinele

Această clasă de compuși cuprinde cofactorii ce conțin fier sub formă neheminică, cu un potențial redox foarte scăzut, Feredoxinele sunt larg răspândite la bacterii anaerobe, la bacteriile fotosintetizante, precum și în cloroplastele unor plante superioare.

Rolul feredoxinei în procesele de fotosinteză, fixarea azotului molecular și formarea amoniacului este prezentat schematic în figura 75. Situsurile fier – sulf reprezintă cofactorii de oxido-reducere și sunt alcătuite din 2 – 4 ioni de Fe^{2+} sau Fe^{3+} care se leagă de un număr în general echivalent de atomi de sulf (sub formă de sulfură).

În funcție de localizarea și modul de legare ale atomilor de fier și sulf, aceste situsuri se notează simbolic [4Fe – 2S], [2Fe – 2S] etc., respectiv $(Fe/S)_4$, $(Fe/S)_2$ etc. Există însă și situsuri în care atomii de fier și sulf nu se găsesc într-un număr echivalent, cum ar fi de exemplu situsurile de tipul [3Fe – 4S].

Feredoxina din *Clostridium pasteurianum* a fost prima proteină de acest tip studiată. Ea este o polipeptidă alcătuită din 55 resturi de aminoacizi și are o masă moleculară de 6 kDa. Molecula conține două situsuri fier - sulf ce alcătuiesc o geometrie cubică (fig. 76).

Conținutul în feredoxină al acestei bacterii este cunoscut, el reprezentând aproximativ 1% din proteinele totale. Fiecare atom de fier este înconjurat de patru atomi de sulf din care unul este atomul de sulf al unui rest de cisteină, iar ceilalți trei sunt reprezentați de așa-numitul sulf acido-solubil, fiind vorba de ionii S^{2-} înglobați în complexul proteic ce pot fi ușor extrași sub formă de H_2S în mediu acid.

BCU IAȘI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

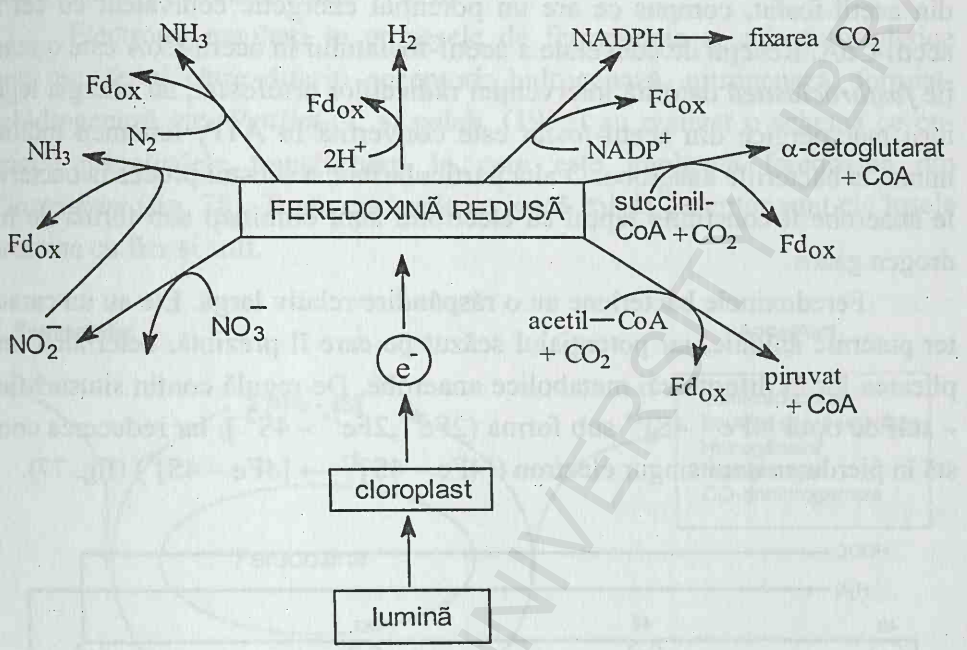
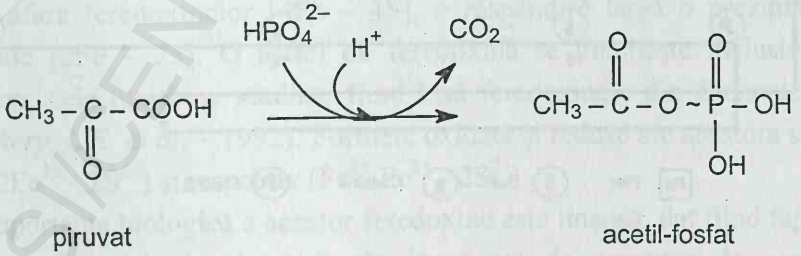


Fig. 76. Rolul feredoxinei în diferite procese metabolice (Dumitru I.F., 1980)

La speciile aparținând genului *Clostridium*, feredoxina este implicată în reacția de decarboxilare a piruvatului cu formare de acetil-fosfat:



În cazul decarboxilării oxidative a piruvatului în organismele aerobe, procesul are loc cu formare de acetil-CoA, fiind catalizat de complexul multienzimatic numit ***piruvat-dehidrogenază***. Această transformare poate avea loc și în organismele anaerobe, sub acțiunea unei ***piruvat-oxidoreductaze*** speciale (EC 1.2.3.3) ce nu conține în calitate de cofactor nici

acidul lipoic şi nici coenzime flavinice. În acest caz, acetil-CoA se formează din acetil-fosfat, compus ce are un potențial energetic echivalent cu cel al acetil-CoA. Reacția de conversie a acetil-fosfatului în acetil-CoA este o reacție ***fosforoclastică*** datorită intervenției radicalilor ortofosfat, iar energia legăturii macroergice din acetil-fosfat este convertită în ATP, fenomen întâlnit numai la bacteriile anaerobe. O altă particularitate a acestui proces la bacteriile anaerobe îl constituie faptul că electronii sunt eliminați sub formă de hidrogen gazos.

Feredoxinele bacteriene au o răspândire relativ largă. Ele au un caracter puternic anionic, iar potențialul scăzut pe care îl prezintă, determină implicarea lor în diferite căi metabolice anaerobe. De regulă conțin situsuri fier – sulf de tipul $[4Fe-4S]^{2+}$ sub forma $(2Fe^{3+},2Fe^{2+} - 4S^{2-}]$, iar reducerea constă în pierderea unui singur electron ($[4Fe-4S]^{2+} \rightarrow [4Fe-4S]^{+}$) (fig. 77).

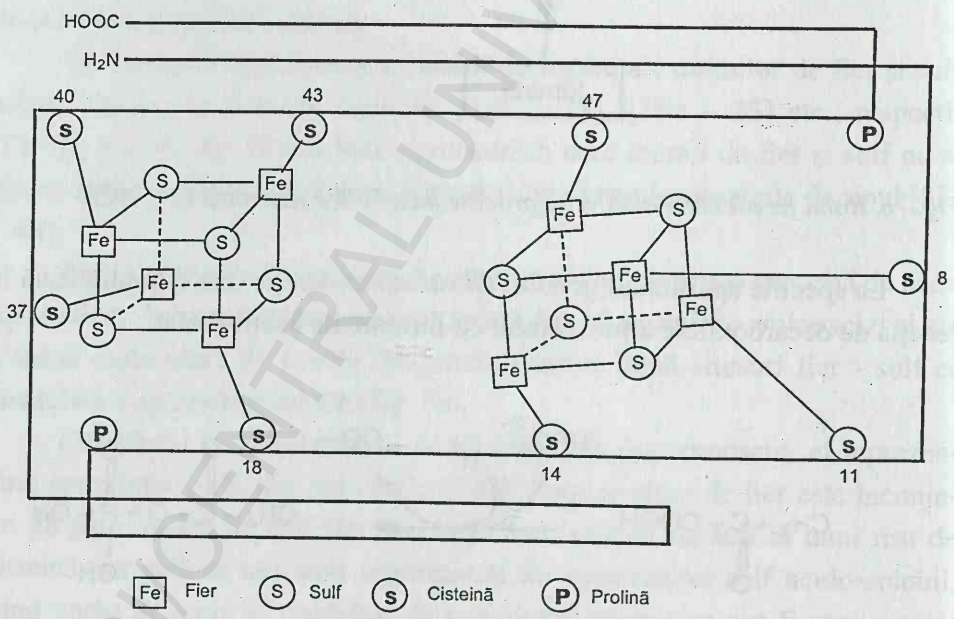


Fig. 77. Localizarea spațială a situsurilor fier – sulf la feredoxina din Clostridium pasteurianum (Pelmont, J. – 1995)

Aceasta înseamnă că o feredoxină ce conține două situsuri fier – sulf poate transporta doi electroni. Feredoxina din *Clostridium pasteurianum* are un potențial de aproximativ –400 mV şi se pare că există mici diferențe de

reactivitate între feredoxinele din specii diferite aparținând genului *Clostridium*. (*Bertini, L. et al.* – 1992).

Electronii rezultați în procesele de fermentație și cele fotosintetice sunt transferați către diferiți acceptori: hidrogenază, nitrogenază, formiat-dehidrogenază etc. *Petillot, Y.* și colab. (1995) au realizat o schemă ce cuprinde principalele transformări în care este implicată feredoxina din *Clostridium* (fig. 78). Toate enzimele ce joacă rol de acceptor sunt ele însele proteine cu fier și sulf.

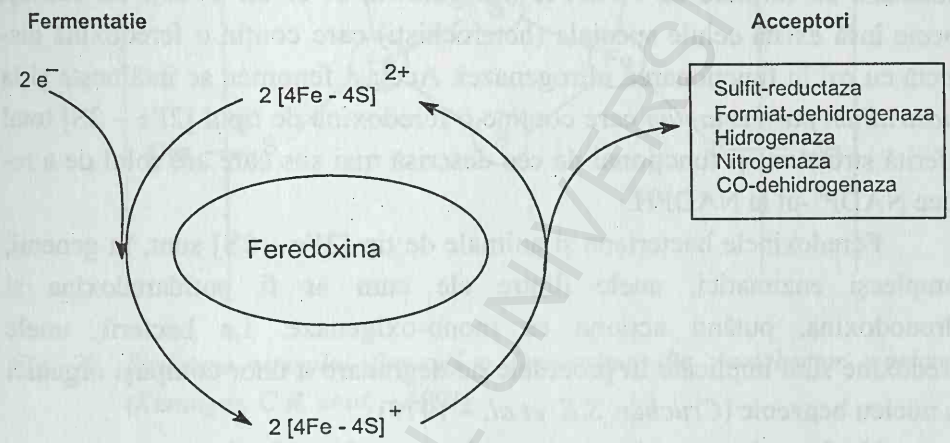


Fig. 78. Principalele fenomene redox în care este implicată feredoxina bacteriană (Petillot, Y. et al. – 1995)

În afara feredoxinelor [4Fe – 4S], o răspândire largă o prezintă și feredoxinele [2Fe – 2S]. O astfel de feredoxină se întâlnește inclusiv la *Clostridium*, cele mai bine studiate fiind însă feredoxinele din *Escherichia coli* (*Vickery, L.E. et al.* – 1992). Formele oxidate și reduse ale acestora sunt de tipul ($2Fe^{3+}$ - $2S^{2-}$) și respectiv (Fe^{3+},Fe^{2+} - $2S^{2-}$).

Importanța biologică a acestor feredoxine este imensă, dat fiind faptul că în cloroplaste și cianobacterii ele joacă rol de acceptori în cadrul fotosistemului I. Studii recente au demonstrat faptul că există trei grupe de feredoxine [2Fe – 2S]. Un prim grup îl constituie feredoxinele de „tip vegetal" răspândit în cloroplaste și la cianobacterii. Un alt grup cuprinde feredoxinele bacteriene ce intervin în diferite procese metabolice cum ar fi reducerea nitraților la amoniac, biosinteza glutamatului, asimilarea sulfatului

anorganic etc. Dintre acestea, cea mai cunoscută este ***putidaredoxina*** întâlnită la *Pseudomonas putida* (*Lea, P.J. et al.* – 1984). În fine, al treilea grup cuprinde feredoxinele de la vertebrate, cele mai importante fiind feredoxina placentară umană şi feredoxina din glandele suprarenale de bou numită ***adrenodoxină.***

Una şi aceeaşi specie poate conține mai multe tipuri de feredoxine. Astfel, la cianobacteria *Anabaena 7120* se întâlneşte o feredoxină de tip [2Fe – 2S] care are rolul de a transporta electronii în fotosistemul I la $NADP^+$ - reductază cu formare de NADPH (*Akegatawa, J. et al.*–1980). La aceeaşi specie însă există celule speciale (heterochişti) care conțin o feredoxină distinctă cu rol în funcționarea nitrogenazei. Acelaşi fenomen se întâlneşte şi la *Clostridium pasteurianum* care conține o feredoxină de tipul [2Fe – 2S] total diferită structural şi funcțional de cea descrisă mai sus care are rolul de a reduce $NADP^+$-ul la NADPH.

Feredoxinele bacteriene şi animale de tip [2Fe – 2S] sunt, în general, complecşi enzimatici, unele dintre ele cum ar fi putidaredoxina şi adrenodoxina, putând acționa ca mono-oxigenaze. La bacterii, unele feredoxine sunt implicate în procesele de degradare a unor compuşi organici cu nucleu benzenic (*Crucher, S.E. et al.* – 1979).

Unele microorganisme (*Azotobacter*, *Desulfovibrio* etc.) conțin feredoxine de tipul [3Fe – 3S] a căror structură a rămas mult timp necunoscută, iar *Azotobacter vinelandii* mai conține şi o altă feredoxină de tipul [4Fe – 4S]. Situsul fier – sulf la aceasta din urmă se leagă de catenele polipeptidice prin atomii de fier, la nivelul unor resturi de cisteină (fig. 79).

Se pare că situsurile [3Fe – 4S] mai prezintă şi un al patrulea ion metalic care este mobil şi foarte reactiv, ceea ce conferă feredoxinei proprietăți speciale.

BCU IAŞI/CENTRU UNIVERSITAR/LIBRARY

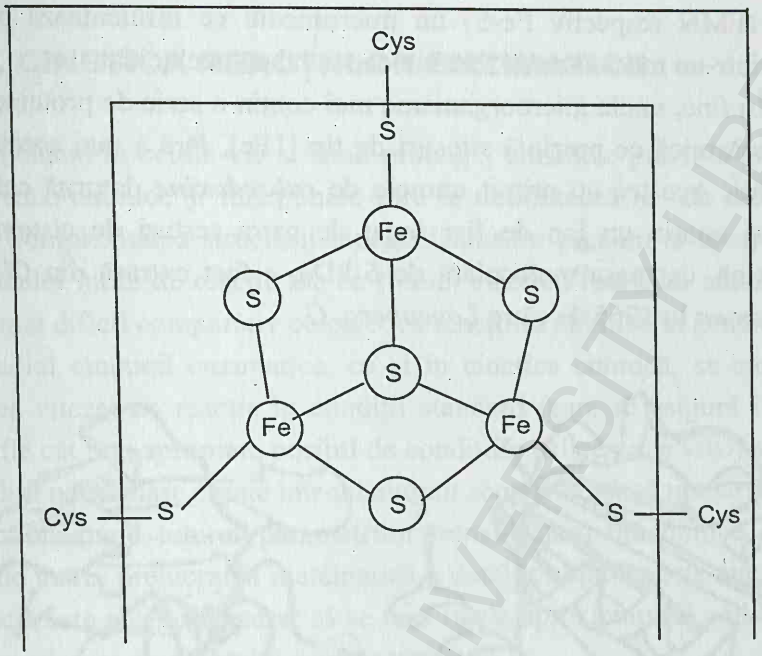


Fig. 79. Structura situsului fier-sulf a feredoxinei din Azotobacter vinelandii (Kissinger, C.R. et al. – 1991)

Cercetări recente au demonstrat faptul că unele bacterii pot fi cultivate pe medii cu carență în fier fără a le fi afectat metabolismul energetic. Acest lucru se explică prin capacitatea bacteriilor respective de a sintetiza o serie de proteine numite ***flavodoxine*** ce anulează efectul lipsei fierului. Flavodoxinele conțin un cofactor flavinic (cel mai probabil FMN) şi joacă rol de transportori de electroni ce înlocuiesc feredoxinele.

Capacitatea de a utiliza alternativ feredoxinele sau flavodoxinele în calitate de transportori de electroni în una şi aceiaşi secvență metabolică este des întâlnită în natură, mai ales în lumea microorganismelor. *Rypniewski, W.R. et al.* au elucidat structura flavodoxinei din alga *Chondrus crispus* prin cristalografie şi au comparat-o cu structura feredoxinei de tip [2Fe – 2S] de la cianobacterii (*Anabaena*). Ambele proteine se caracterizează prin prezența unui fragment β-pliat (fig. 80).

Se remarcă de asemenea localizarea periferică a cofactorului flavinic (FMN) în cazul flavodoxinei şi respectiv a situsului fier – sulf din structura feredoxinei. În ambele cazuri catena polipeptidică creează pentru aceste

situsuri (FMN respectiv Fe-S) un micromediu ce influențează potențialul redox printr-un mecanism ce rămâne deocamdată neelucidat.

În fine, unele microorganisme mai conțin o serie de proteine cu masă moleculară mică ce prezintă situsuri de tip [1Fe], fără a mai conține și sulf acido-labil. Acestea au primit numele de ***rubredoxine*** datorită culorii roșii intense și conțin un ion de fier legat de patru resturi de cisteină. Prima rubredoxină, cu masa moleculară de 6 kDa, a fost extrasă din *Clostridium pasteurianum* în 1965 de către *Lovenberg, G.*

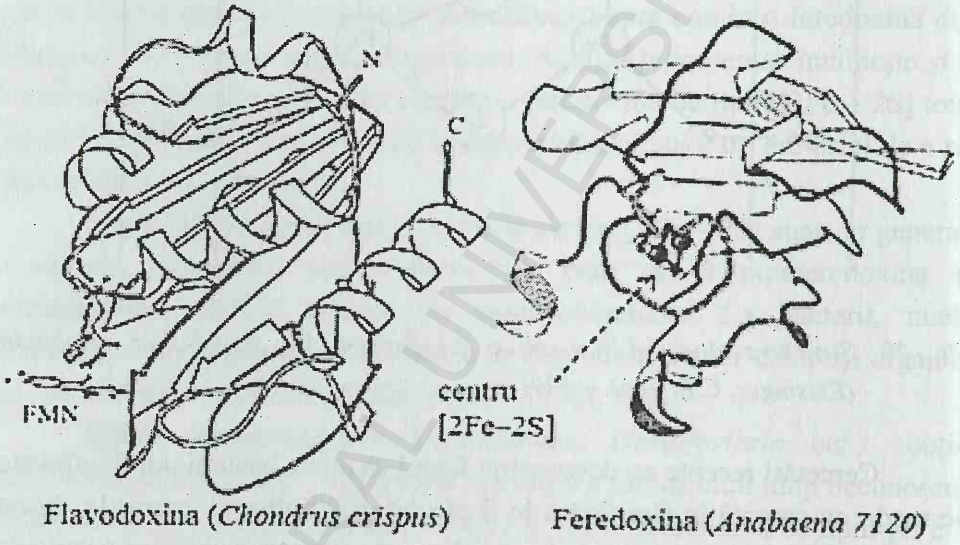


Fig. 80. Modelul structural al flavodoxinei algale (Chondrus crispus) și respectiv al feredoxinei din cianobacterii (Anabaena) (Rypniewski, W. R. et al – 1991)

Se pare că această proteină poate înlocui feredoxinele în anumite condiții fiziologice cum ar fi carența de fier. Spre deosebire de feredoxine, rubredoxinele au un potențial standard diferit (– 57 ÷ + 20 mV). *In vitro*, rubredoxinele au capacitatea de a reduce citocromul c, monoxidul de carbon și anionii NO_3^- sub acțiunea unei reductaze specifice și în prezența NADH-ului ca sursă de electroni (*Moura, I. et al.* – 1990). În prezent se cunosc peste zece rubredoxine ce alcătuiesc o familie de proteine cu masă moleculară mică.

BCU CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

IV. CINETICA REACȚIILOR ENZIMATICE

Acționând în celula vie şi fiind proteine, enzimele prezintă unele proprietăți fizico-chimice şi funcționale care le delimitează net de catalizatorii chimici. Complexitatea structurii biocatalizatorilor precum şi complexitatea mecanismului intim de reacție fac ca studiul cineticii reacțiilor enzimatice să fie mult mai dificil comparativ cu cinetica reacțiilor chimice în general.

Studiul cineticii enzimatice, ca şi în cinetica chimică, se bazează pe măsurarea vitezei de reacție în condiții standard (care se asigură în aşa fel încât să fie cât mai apropiate posibil de condițiile existente *in vivo*) şi în diferite condiții particulare create într-un anumit scop. Cum însă numărul variabilelor ce corespund tuturor parametrilor transformării biochimice date este extrem de mare, prelucrarea matematică a datelor obținute este atât de complexă încât este absolut necesar să se facă unele aproximații în vederea reducerii la maximum a numărului acestor variabile.

IV.1 NOȚIUNI GENERALE DE TERMODINAMICĂ ENZIMATICĂ

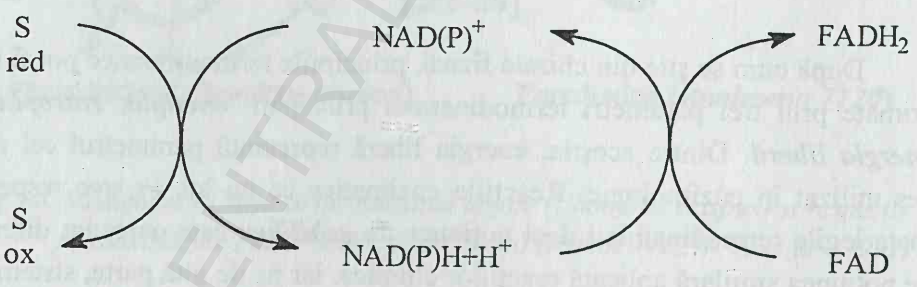
După cum se ştie din chimia fizică, principiile termodinamice pot fi exprimate prin trei parametri termodinamici principali: ***entalpia, entropia*** şi ***energia liberă***. Dintre aceştia, energia liberă reprezintă parametrul cel mai des utilizat în enzimologie. Reacțiile enzimatice ce au loc *in vivo* respectă toate legile termodinamicii deşi noțiunea de ***echilibru*** este oarecum diferită de noțiunea similară aplicată reacțiilor chimice, iar pe de altă parte, sistemele biologice se caracterizează prin existența ***reacțiilor cuplate*** în care produsul unei reacții este substrat pentru reacția următoare.

$$S_1 \underset{(1)}{\overset{E_1}{\rightleftharpoons}} S_2 \underset{(2)}{\overset{E_2}{\rightleftharpoons}} S_3 \underset{(3)}{\overset{E_3}{\rightleftharpoons}} S_4$$

$$\Delta G_1 \qquad \Delta G_2 \qquad \Delta G_3$$

În cazul particular în care $\Delta G_2=0$ se realizează echilibrul $S_2 \rightleftharpoons S_3$, iar dacă, concomitent cu aceasta $\Delta G_1<0$ prima etapă decurge normal, iar S_2 se

acumulează în mediu şi, conform principiului lui *Le Chatelier*, deplasează echilibrul reacţiei 2 spre dreapta. Dacă şi $\Delta G_3<0$, echilibrul reacţiei 2 este deplasat în sensul sintezei substanţei consumate în reacţia 3, deci întregul sistem funcţionează conform reacţiei totale $S_1 \rightleftharpoons S_4$. Dacă însă $\Delta G_2>0$, echilibrul reacţiei 2 este deplasat spre stânga, iar dacă în acelaşi timp $\Delta G_1<0$ şi are un ordin de mărime mai mic decât ΔG_2, deplasarea echilibrului primei reacţii este compensată de tendinţa reacţiei 2 de a-şi deplasa echilibrul spre stânga. Cu toate acestea însă, dacă $\Delta G_3<0$ şi $(\Delta G_1+\Delta G_3)<\Delta G_2$ întregul sistem îşi deplasează echilibrul spre dreapta. Ţinând cont de toate acestea se poate concluziona că în cazul reacţiilor cuplate, echilibrele sunt deplasate spre dreapta dacă $\Delta G_1<0$ şi nu sunt influenţate de numărul etapelor intermediare sau de numărul reactanţilor. Conjuncţia între două reacţii ale unui astfel de sistem este asigurată de prezenţa unui proton, electron sau a unui compus cu structură complexă. Un exemplu concludent în acest sens îl reprezintă reacţiile catalizate de dehidrogenazele $NAD(P)^+$-dependente. În asemenea situaţii, coenzima dehidrogenazei trece în formă redusă ca urmare a dehidrogenării substratului şi se regenerează în forma sa oxidată într-o reacţie cuplată cu prima când cedează protonii şi electronii unei molecule de FAD oxidată:



În reacţiile metabolice cheie există mecanisme enzimatice speciale numite ***reacţii antiparalele unidirecţionale*** sau ***bucle ireversibile*** ce pot fi explicate din punct de vedere termodinamic. De exemplu, la conversia fructozo-6-fosfatului în fructozo-1,6-difosfat sub acţiunea ***fosfo-fructokinazei*** în prezenţa ATP-ului, valoarea entalpiei libere este negativă, iar reacţia este practic ireversibilă. Reacţia inversă are totuşi loc dar în absenţa ATP-ului şi este catalizată de o altă enzimă – ***fructozo-1,6-difosfataza***. Dacă cele două enzime ar acţiona concomitent, ar avea loc o hidroliză necontrolată a ATP-ului. Această pierdere inutilă de energie este împiedicată de celula vie prin meca-

nisme proprii de reglare. Astfel, fosfofructokinaza este activată în prezența AMP-ului în timp ce ATP-ul este inhibitor, iar fructozo-1,6-difosfataza este inhibată de AMP. De aceea în cazul creşterii raportului ATP/AMP echilibrul este deplasat în sensul hidrolizei fiind stimulată gluconeogeneza, iar în cazul diminuării acestui raport este favorizată reacția de fosforilare, fiind stimulată glicoliza.

Dacă presupunem posibilitatea realizării unei reacții în trei moduri posibile (fără catalizator, în prezența unui catalizator chimic şi respectiv sub acțiunea unei enzime specifice) diagrama variației energiei libere este diferită, enzima diminuând la maximum energia liberă, acea ***barieră energetică*** ce trebuie depăşită de reactanți pentru a reacționa (fig. 81).

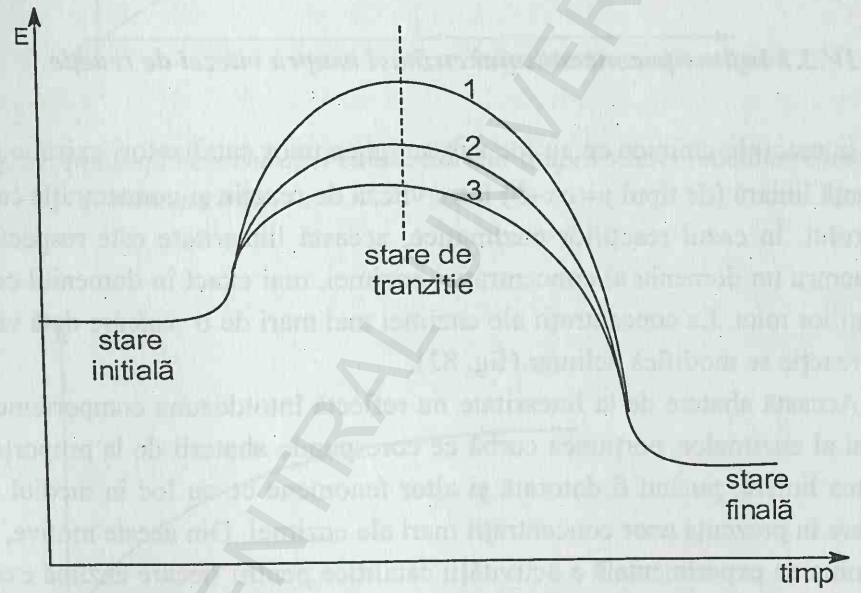


Fig. 81. Variația energiei libere în timpul unei reacții necatalizate (1), în prezența unui catalizator chimic (2) şi în prezența unei enzime specifice (3).

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

IV.2 INFLUENȚA UNOR FACTORI FIZICO-CHIMICI ASUPRA VITEZEI REACȚIILOR ENZIMATICE

Acționând în organismele vii, enzimele se comportă total diferit față de catalizatorii chimici la acțiunea unor factori de mediu. Astfel, enzimele își manifestă activitatea catalitică maximă în condiții fiziologic normale de pH, temperatură, presiune osmotică etc. Pe de altă parte, dinamica activității enzimatice la concentrații diferite ale substratului, enzimei, modulatorilor etc. este de asemenea diferită.

IV.2.1 Influența concentrației enzimei asupra vitezei de reacție

În reacțiile chimice ce au loc sub acțiunea unor catalizatori există o dependență liniară (de tipul $y=ax+b$) între viteza de reacție și concentrația catalizatorului. În cazul reacțiilor enzimatice, această linearitate este respectată doar pentru un domeniu al concentrației enzimei, mai exact în domeniul concentrațiilor mici. La concentrații ale enzimei mai mari de o valoare dată viteza de reacție se modifică neliniar (fig. 82).

Această abatere de la linearitate nu reflectă întotdeauna comportamentul real al enzimelor, porțiunea curbă ce corespunde abaterii de la proporționalitatea liniară, putând fi datorată și altor fenomene ce au loc în mediul de incubare în prezența unor concentrații mari ale enzimei. Din aceste motive, în determinarea experimentală a activității catalitice pentru fiecare enzimă există un domeniu de valabilitate (intervalul de concentrații 0A din figura 81) în care rezultatele sunt reale și reproductibile. Cu cât concentrația enzimei depășește mai mult valoarea A, cu atât eroarea determinării este mai mare.

În multe situații, graficul dependenței vitezei de reacție de concentrația enzimei poate să nu treacă prin originea axelor rectangulare ci să intersecteze abscisa sau ordonata intr-un anumit punct. Acest lucru poate fi datorat existenței unor impurități în preparatul enzimatic sau altor fenomene ce au loc în mediul de incubare. O situație aparte o prezintă enzimele proteolitice la care dependența vitezei de reacție de concentrația enzimei este neliniară (fig.83).

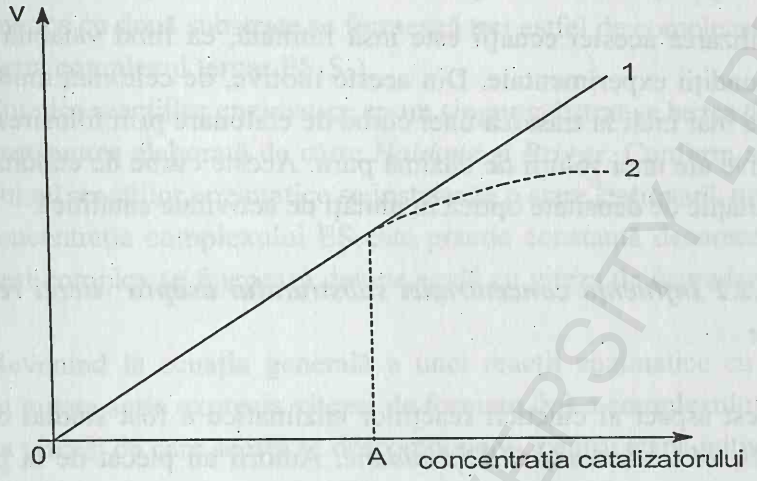


Fig. 82. Influența concentrației catalizatorului asupra vitezei reacțiilor chimice (1) și enzimatice (2)

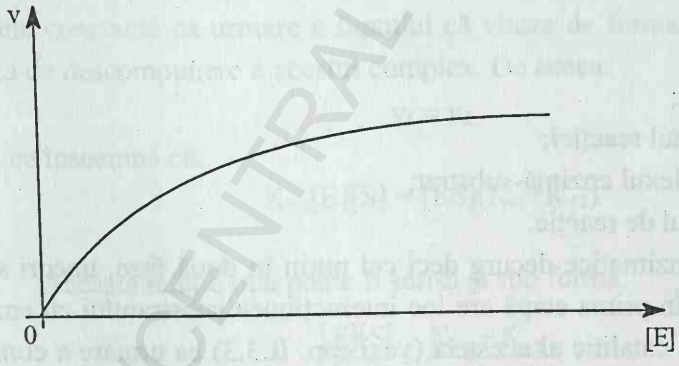


Fig.83. Dependența vitezei de reacție de concentrația enzimelor proteolitice

Mai mulți autori au încercat să găsească ecuații empirice care să definească aceste dependențe. Cea mai acceptată a fost ecuația elaborată de *Schütz* conform căreia viteza reacțiilor de proteoliză este proporțională cu rădăcina pătrată a concentrației enzimei:

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

$$v=K[E]^{1/2}$$

Utilizarea acestei ecuații este însă limitată, ea fiind valabilă doar în anumite condiții experimentale. Din aceste motive, de cele mai multe ori se procedează mai întâi la trasarea unei curbe de etalonare prin folosirea diluțiilor succesive ale unei soluții de enzimă pură. Aceste curbe de etalonare convertesc unitățile de densitate optică în unități de activitate catalitică.

IV.2.2 Influența concentrației substratului asupra vitezei reacțiilor enzimatice

Acest aspect al cineticii reacțiilor enzimatice a fost studiat de către *L.Michaelis, M.L.Menten* şi *J.B.S.Haldane*. Autorii au plecat de la premiza existenței complexului intermediar enzimă-substrat (ES) şi au studiat acest aspect cinetic pentru reacțiile enzimatice cu un singur substrat:

$$E + S \underset{K_{-1}}{\overset{K_{+1}}{\rightleftharpoons}} ES \xrightarrow{K_{+2}} E + P$$

unde:

E – enzima;

S – substratul reacției;

ES – complexul enzimă-substrat;

P – produsul de reacție.

Reacțiile enzimatice decurg deci cel puțin în două faze, uneori separabile, alteori nu. În prima etapă are loc interacțiunea substratului cu enzima la nivelul situsului catalitic al acesteia (vezi cap. II.3.3) ca urmare a complementarității stereochimice a acestora. În această fază se formează complexul intermediar ***enzimă-substrat*** (***ES***) care se mai numeşte ***complex Michaelis***.

În etapa următoare, acest complex bogat în energie se poate scinda pe calea inversă (regenerând substratul şi enzima) sau poate realiza transformarea propriu-zisă a substratului când se formează produsul de reacție şi se regenerează catalizatorul.

În marea majoritate a cazurilor însă, reacțiile enzimatice sunt cu două sau mai multe substrate. Pentru aceste transformări, enzima formează mai

mulți complecși, adevăratul complex Michaelis fiind considerat cel care determină viteza reacției totale în cel mai înalt grad. De exemplu, pentru reacțiile enzimatice cu două substrate se formează trei astfel de complecși (ES_1, ES_2 și respectiv complexul ternar ES_1S_2).

Cinetica reacțiilor enzimatice cu un singur substrat se bazează pe **teoria stării staționare** elaborată de către *Haldane* și *Briggs*. Conform acestei teorii, în cursul reacțiilor enzimatice se instalează o stare staționară, un echilibru, când concentrația complexului ES este practic constantă deoarece viteza cu care acest complex se formează devine egală cu viteza de degradare a acestuia.

Revenind la ecuația generală a unei reacții enzimatice cu un singur substrat putem scrie expresia vitezei de formare (v_f) a complexului ES și respectiv a vitezei cu care acesta se descompune v_d, pentru etapa inițială:

$$v_f = K_{+1}[E][S]$$

și respectiv:

$$v_d = K_{-1}[ES] + K_{+2}[ES] = [ES](K_{-1}+K_{+2})$$

După instalarea stării de echilibru, concentrația complexului ES rămâne constantă ca urmare a faptului că viteza de formare devine egală cu viteza de descompunere a acestui complex. De aceea:

$$v_f = v_d$$

ceea ce înseamnă că:

$$K_{+1}[E][S] = [ES](K_{-1}+K_{+2})$$

Această relație mai poate fi scrisă și sub forma:

$$\frac{[E][S]}{[ES]} = \frac{K_{-1}+K_{+2}}{K_{+1}}$$

Cea de a doua fracție reprezintă un raport de constante, ceea ce înseamnă că valoarea ei este o constantă, care a fost notată cu K_M:

$$\frac{K_{-1}+K_{+2}}{K_{+1}} = \text{constant} = K_M$$

Deci:

$$K_M = \frac{[E][S]}{[ES]}$$

În momentul instalării stării de echilibru, enzima există în mediu atât sub formă liberă cât şi sub forma complexului ES. Deci concentraţia totală a enzimei [E_t] va fi dată de relaţia:

$$[E_t] = [E] + [ES]$$

Introducând valoarea concentraţiei enzimei libere ([E] = [E_t] -[ES]) în formula constantei K_M obţinem:

$$K_M = \frac{([E_t] - [ES])[S]}{[ES]}$$

Rearanjând termenii şi explicitând în funcţie de [ES] obţinem:

$$K_M \cdot [ES] = ([E_t] - [ES]) \cdot [S]$$

sau:

$$K_M \cdot [ES] = [E_t] \cdot [S] - [ES] \cdot [S]$$

sau:

$$K_M[ES] + [S] \cdot [ES] = [E_t] \cdot [S]$$

de unde:

$$[ES](K_M + [S]) = [E_t] \cdot [S]$$

sau:

$$[ES] = \frac{[E_t] \cdot [S]}{K_M + [S]}$$

Dar viteza reacţiei enzimatice propriu-zise este reprezentată de fapt de viteza cu care complexul ES se descompune în sensul formării produsului P:

$$\mathbf{v = k\,[ES]}$$

Dacă întreaga cantitate de enzimă ar fi legată sub forma complexului ES, enzima ar cataliza reacţia respectivă cu viteza maximă (V_{max}) teoretic posibilă:

$$V_{max} = k\,[E_t] = k\,[ES]$$

BCU IAŞI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Din ultimele două relații se poate deduce:

$$k = \frac{V_{max}}{[E_t]} \quad \text{deci:} \qquad v = \frac{V_{max} \cdot [ES]}{[E_t]}$$

În ultima relație, înlocuim valoarea concentrației complexului ES prin valoarea sa:

$$v = \frac{V_{max} \cdot [ES]}{[E_t]} = \frac{\dfrac{V_{max} \cdot [E_t] \cdot [S]}{K_M + [S]}}{E_t} = \frac{V_{max} \cdot [E_t] \cdot [S]}{[E_t] \cdot (K_M + [S])}$$

deci:

$$\boxed{v = \frac{V_{max} \cdot [S]}{K_M + [S]}}$$

Această ecuație reflectă dependența vitezei reacțiilor enzimatice de concentrația substratului și poartă numele de ***ecuația Michaelis-Menten***. Reprezentarea grafică a acestei ecuații în sistemul de axe rectangulare, în care concentrația substratului se trece pe abscisă, iar viteza de reacție pe axa ordonatelor, se prezintă sub o formă de arc de hiperbolă (fig. 84).

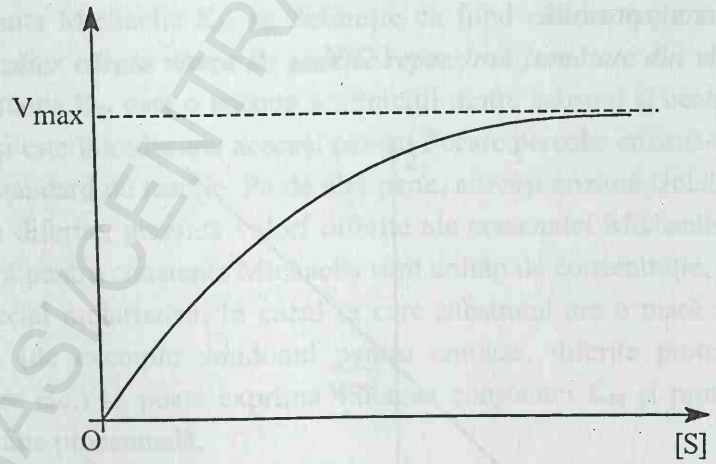


Fig. 84. Reprezentarea grafică a ecuației Michaelis-Menten

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

În această reprezentare, curba tinde asimptotic către paralela la abscisă dusă din punctul V_{max}. Din punct de vedere practic, această reprezentare grafică determină erori relativ mari pe de o parte din cauza stabilirii cu dificultate a punctului V_{max} pe axa ordonatelor, iar pe de altă parte din cauza faptului că la concentrații relativ mari de substrat intervin fenomene secundare printre care și inhibiția prin substrat a activității enzimatice.

Pentru micșorarea erorilor de determinare, se utilizează reprezentarea grafică a valorilor inverse, ecuație obținută de către *Lineweaver* și *Burk* prin prelucrarea matematică a ecuației Michaelis-Menten:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_M}{V_{max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}}$$

Reprezentarea grafică a acestei ecuații (1/v în funcție de 1/[s]) dă o dreaptă ce intersectează axa absciselor în punctul - $1/K_M$ și axa ordonatelor în punctul $1/V_{max}$ (fig. 85).

Pentru a putea defini și caracteriza constanta K_M, ecuația Michaelis-Menten poate fi prelucrată în continuare, făcând unele artificii de calcul. Deoarece viteza maximă V_{max} nu poate fi obținută în mod practic la realizarea nici unei transformări enzimatice *in vitro*, se presupune că reacția enzimatică luată în studiu ar decurge cu o viteză ce reprezintă jumătate din viteza maximă teoretic posibilă:

$$v = 1/2 \cdot V_{max}$$

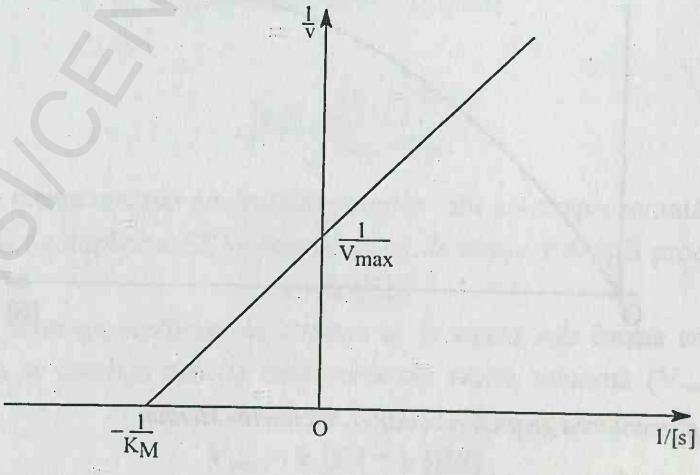


Fig. 85. Reprezentarea grafică a ecuației Lineweaver-Burk

BCU IAȘI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

În această situație, ecuația Michaelis-Menten devine:

$$v = \frac{V_{max} \cdot [S]}{K_M + [S]} \quad \Rightarrow \quad vK_M + v[S] = V_{max} \cdot [S]$$

Înlocuind v cu valoarea sa obținem:

$$\frac{V_{max} \cdot K_M}{2} + \frac{V_{max} \cdot [S]}{2} = V_{max} \cdot [S]$$

Eliminând numitorii în această proporție rezultă:

$$V_{max} \cdot K_M + V_{max} \cdot [S] = 2\, V_{max} \cdot [S]$$

sau:

$$V_{max} \cdot K_M = V_{max} \cdot [S]$$

Din ultima relație rezultă:

$$\boxed{K_M = [S]}$$

În funcție de această relație și ținând cont de modul cum a fost ea dedusă, constanta Michaelis K_M se definește ca fiind ***concentrația substratului corespunzător căreia viteza de reacție reprezintă jumătate din viteza maximă***. Constanta K_M este o măsură a afinității dintre substrat și centrul activ al enzimei și este întotdeauna aceeași pentru fiecare pereche enzimă-substrat, în condiții standard de reacție. Pe de altă parte, aceeași enzimă izolată din surse biologice diferite, prezintă valori diferite ale constantei Michaelis. Unitățile de măsură pentru constanta Michaelis sunt unități de concentrație, utilizându-se în special molaritatea. În cazul în care substratul are o masă moleculară variabilă (de exemplu amidonul pentru amilaze, diferite proteine pentru proteinaze etc.) se poate exprima valoarea constantei K_M și prin unități de concentrație procentuală.

Cu cât valoarea constantei K_M este mai mică cu atât afinitatea dintre enzimă și substrat este mai mare. și invers. Caracterizarea oricărei enzime din punct de vedere structural și funcțional este incompletă fără determinarea constantei K_M față de substratul său natural, în condiții standard de reacție.

BCU CLUJ UNIVERSITY LIBRARY

În afara dependenței valorilor inverse (ecuația Lineweaver-Burk), ecuația Michaelis-Menten a mai fost modificată matematic şi de alți autori, în vederea facilității calculului constantei K_M. Astfel, *Eadie* şi *Hofstee* prezintă o formulare modificată a acestei dependențe prin formula:

$$v = V_{max} - \frac{1}{K_M \cdot [S]}$$

Reprezentarea grafică a acestei formule când pe axa absciselor se iau valori succesive ale parametrului v/[s], iar pe ordonată v, reprezintă o dreaptă cu panta $-1/K_M$ ce intersectează axa 0y în punctul V_{max} şi axa 0x în punctul $V_{max}/[s]$. În mod similar, *Hanes* reprezintă grafic [s]/v în funcție de v, iar *Kuhn* reprezintă v în funcție de log [s]. În primul caz rezultă o reprezentare lineară, iar în al doilea caz rezultă o curbă sigmoidă cu un punct de inflexiune ce corespunde lui K_M.

Studiul cineticii reacțiilor enzimatice în fază staționară nu poate da indicații privind numărul şi durata etapelor intermediare, neputând fi determinate constantele de viteză individuale. Enzimele ce prezintă valori mari ale constantei K_M au o mică afinitate pentru substratele lor şi realizează actul catalitic în intervale de timp de ordinul 10^{-1} secunde, în timp ce enzimele cu afinitate mare realizează actul catalitic mult mai rapid, în aproximativ 10^{-6} secunde. În cazul acestora din urmă este necesară utilizarea unor tehnici de cinetică rapidă. Acestea se bazează fie pe studiul ***fazei prestaționale***, fie prin perturbarea echilibrului prin diferite metode. Se mai poate utiliza efectuarea transformării enzimatice date la temperaturi foarte scăzute (–40°C) în prezența unor substanțe ce micşorează temperatura de îngheț a apei (de exemplu etilenglicol).

Dacă se ia în considerare acelaşi tip de reacție, cu un singur substrat, un singur complex enzimă-substrat şi un singur produs de tipul:

$$E + S \underset{k_{-1}}{\overset{k_{+1}}{\rightleftharpoons}} ES \xrightarrow{k_{+2}} P + E$$

se poate urmări dinamica concentrațiilor substratului, produsului, complexului ES şi a enzimei libere. Reprezentând grafic această dinamică (luând pe

abscisă timpul, iar pe ordonată concentrațiile parametrilor respectivi), se observă inițial o așa-numită ***fază prestațională*** (intervalul de timp 0-t_1) când se formează complexul ES care, prin scindare, formează primele molecule de produs (fig. 86).

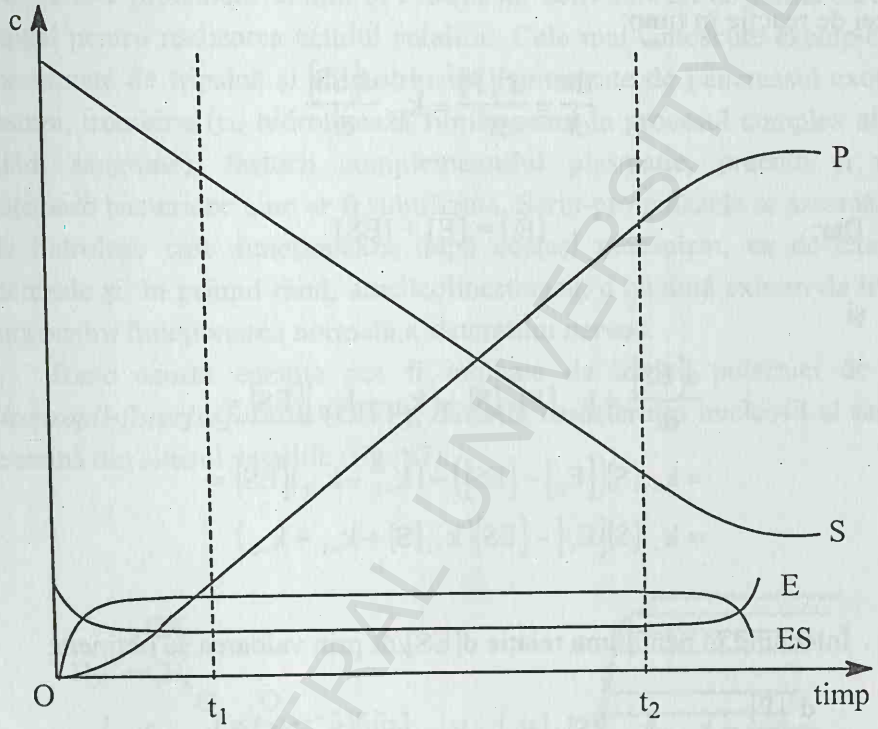


Fig. 86. Cinetica unei reacții enzimatice cu un singur substrat, cu delimitarea fazelor prestațională, staționară și poststațională

Intervalul de timp imediat următor (t_1-t_2) corespunde ***fazei staționare*** când concentrația complexului ES este constantă și, de asemenea, cantitatea de produs formată în unitatea de timp este constantă. În acest interval de timp concentrațiile enzimei și complexului ES sunt constante, iar concentrația substratului este mult în exces, reacția fiind de ordinul 0. Intervalul de timp următor (>t_2) corespunde ***fazei poststaționare*** când concentrația substratului diminuează treptat el nemaifiind în exces, iar reacția este de ordinul I. În

condițiile de mai sus, viteza de reacție poate fi exprimată ca fiind dată de modificarea concentrației produsului în unitatea de timp:

$$v = \frac{d[P]}{dt} = k_{+2}[ES]$$

Calculând derivata lui v în funcție de timp, se poate calcula variația vitezei de reacție în timp:

$$\frac{dv}{dt} = \frac{d^2[P]}{dt^2} = k_{+2}\frac{d[ES]}{dt}$$

Dar: $[E_t] = [E] + [ES]$

și

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_{+1}[E]\cdot[S] - (k_{-1} + k_{+2})[ES] =$$

$$= k_{+1}[S]([E_t] - [ES]) - (k_{-1} + k_{+2})[ES] =$$

$$= k_{+1}[S][E_t] - [ES](k_{+1}[S] + k_{-1} + k_{+2})$$

Înlocuind în penultima relație d[ES]/dt prin valoarea sa obținem:

$$\frac{d^2[P]}{dt^2} = k_{+1}\cdot k_{+2}\cdot[S]\cdot[E_t] - k_{+2}\cdot[ES](k_{+1}\cdot[S] + k_{-1} + k_{+2})$$

Dacă se ține cont de ecuația vitezei, ultima relație devine:

$$\frac{d^2[P]}{dt^2} + \frac{d[P]}{dt}(k_{+1}\cdot[S] + k_{-1} + k_{+2}) - k_{+1}\cdot k_{+2}\cdot[S]\cdot[E_t] = 0$$

Această expresie finală descrie cinetica reacției enzimatice în orice moment al ei.

Enzime acilate

Reacțiile enzimatice au loc prin formarea unei succesiuni de produși intermediari, cea mai simplă transformare de acest tip realizându-se prin in-

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

termediul a cel puțin unui astfel de intermediar care este complexul ES. În cursul procesului catalitic, substratul sau un derivat al acestuia poate forma temporar legături covalente cu enzima. Acesta este un proces foarte cunoscut în enzimologie, de exemplu în cazul clasic al funcționării serin-proteinazelor și al altor hidrolaze (esteraze, β-lactamaze etc.).

Aceste proteinaze conțin în centrul lor activ un rest de serină care este esențial pentru realizarea actului catalitic. Cele mai cunoscute exemple sunt reprezentate de tripsină și chimotripsină (sintetizate de pancreasul exocrin), elastaza, trombina (ce hidrolizează fibrinogenul în procesul complex al coagulării sanguine), factorii complementului plasmatic, precum și unele proteinaze bacteriene cum ar fi subtilizina. Serin-proteinazele se aseamănă cu alte hidrolaze care funcționează după același mecanism, ca de exemplu esterazele și, în primul rând, acetilcolinesteraza, o enzimă extrem de importantă pentru funcționarea normală a sistemului nervos.

Toate aceste enzime pot fi inhibate de toxicii puternici de tipul ***diizopropil-fluorfosfatului*** (DIFP), datorită caracterului nucleofil al restului de serină din situsul catalitic (fig. 87).

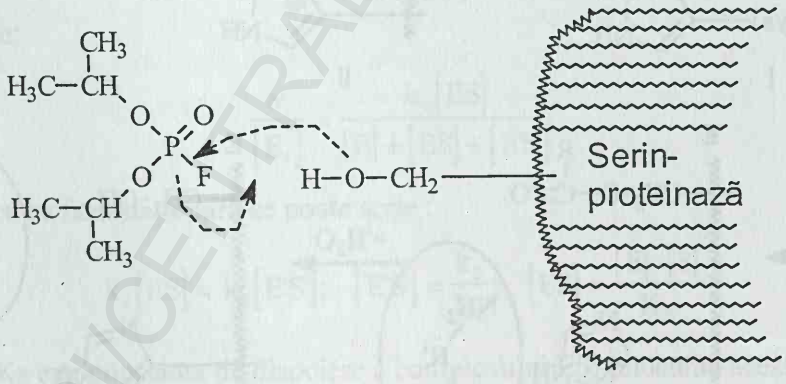


Fig. 87. Interacțiunea DIFP cu centrul activ al serin-proteinazelor

Restul de serină din centrul activ al chimotripsinei este vecin cu un rest de histidină ce aparține, de asemenea, situsului catalitic. În micromediul moleculei de protein-enzimă, gruparea alcoolică primară a restului de serină se comportă ca un donor de protoni, având deci caracter acid. Scindarea legă-

turii peptidice din proteina substrat se realizează în mai multe etape (fig. 88):

- **etapa I**: resturile de serină şi histidină sunt legate printr-o legătură de hidrogen. Histidina expulzează protonul grupei alcoolice a serinei, aceasta din urmă căpătând caracter nucleofil;

- **etapa a II-a**: în această fază se formează complexul enzimă-substrat, atacul realizându-se asupra carbonului carbonilic;

- în **etapa a III-a** are loc o substituţie nucleofilă cu formarea unei legături esterice la nivelul restului de serină şi eliberarea capătului N-terminal al unui produs, ce conţine un atom de hidrogen provenit de la histidină. Această fază reprezintă stadiul de ***acil-enzimă*** când are loc o modificare covalentă temporară a enzimei (are loc acilarea catalizatorului);

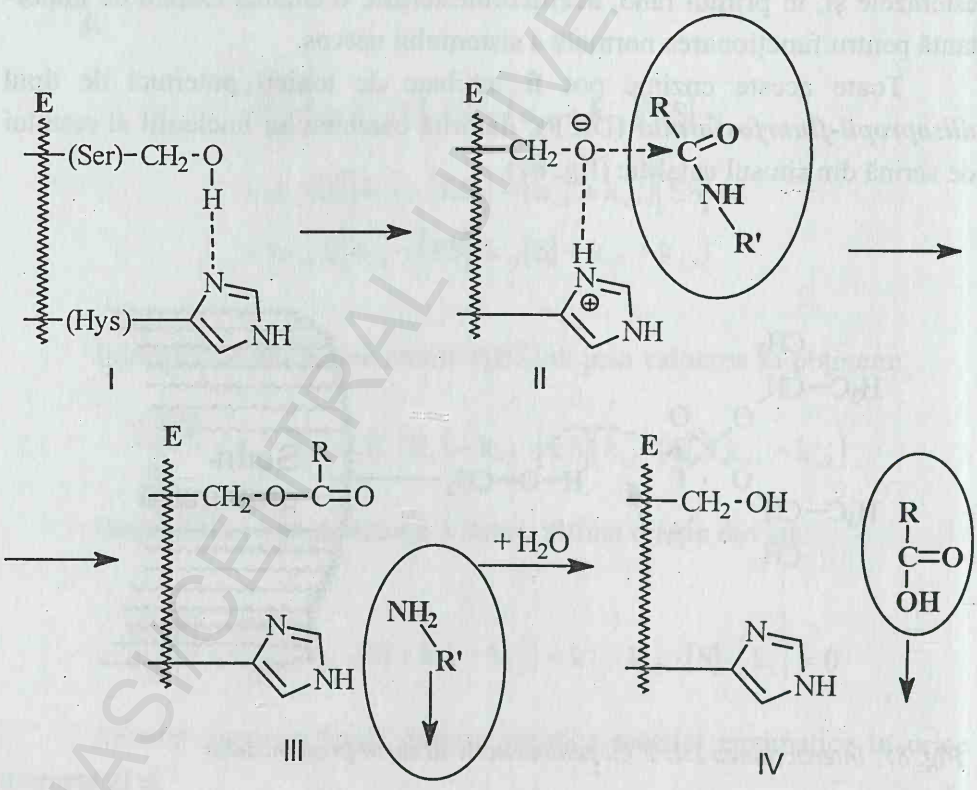
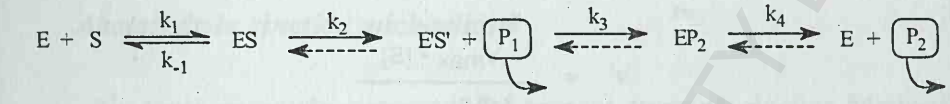


Fig. 88. Reprezentarea schematică a mecanismului hidrolizei legăturilor peptidice de către chimotripsină

- în **etapa a IV-a** se realizează scindarea hidrolitică a legăturii esterice cu eliberarea capătului C-terminal al celui de-al doilea produs (celălalt fragment polipeptidic). Enzima s-a regenerat în forma sa inițială putând relua un nou ciclu de transformări. Fenomenele ce au loc în cele patru faze por fi reprezentate schematic astfel:



În schema de mai sus, E'S' este enzima acilată, P_1 şi P_2 sunt produşii de reacție, adică cele două fragmente polipeptidice rezultate în urma scindării hidrolitice a proteinei substrat. Complecşii ES şi EP_2 sunt consideraţi a fi complecşi Michaelis, deşi EP_2 este complexul enzimei cu unul din produşii care n-a fost încă clivat.

În condițiile determinării vitezei inițiale se neglijează reacția inversă (notată punctat în schemă). Considerând k_{-1} şi k_4 mai mari decât k_2 şi k_3, se poate scrie:

$$[E_t] = [E] + [ES] + [E'S']$$

şi

$$v = k_2[ES]$$

de unde:

$$\frac{v}{[E_t]} = \frac{k_2[ES]}{[E] + [ES] + [E'S']}$$

Dar pentru faza staționară se poate scrie :

$$k_2[ES] = k_3[E'S']; \quad [E'S'] = \frac{k_2}{k_3}; \quad [ES] = \frac{[E]\cdot[S]}{K_S}$$

unde K_S este constanta de disociere a complexului ES. Înlocuind aceste valori în ecuația precedentă rezultă:

$$\frac{v}{[E_t]} = \frac{k_2 \dfrac{[E]\cdot[S]}{K_S}}{[E] + \dfrac{[E]\cdot[S]}{K_S} + \dfrac{k_2}{k_3}\cdot\dfrac{[E]\cdot[S]}{K_S}}$$

Simplificând ultima fracție prin $[E]/K_s$ avem:

$$\frac{v}{[E_t]} = \frac{k_2[S]}{K_S + [S]\left[1 + \frac{k_2}{k_3}\right]} \quad \text{sau} \quad \frac{v}{[E_t]} = \frac{\frac{k_2k_3}{k_2 + k_3} \cdot [S]}{\frac{k_3K_S}{k_2 + k_3} + [S]}$$

şi:

$$v = \frac{V_{max} \cdot [S]}{\frac{k_3K_S}{k_2 + k_3} + [S]}$$

De aici:

$$\boxed{V_{max} = \frac{k_2k_3}{k_2 + k_3} \cdot [E_t]}$$

şi:

$$\boxed{K_M = \frac{k_3K_S}{k_2 + k_3}}$$

Pot exista două situații diferite:

a) deacilarea se face rapid, ceea ce înseamnă că $k_3 >> k_2$; în acest caz constanta K_M este de același ordin de mărime cu K_S de disociere a complexului ES şi atunci:

$$V_{max} = k_2 [E_t]$$

b) dacă deacilarea este lentă, $k_3 << k_2$ şi atunci:

$$K_M = \frac{k_1}{k_2}$$

şi:

$$V_{max} = k_3 [E_t]$$

Se observă că în acest caz constanta Michaelis K_M poate avea o valoare cu mult mai mică decât cea a constantei de disociere (enzima se saturează la valori mici ale concentrației substratului deoarece ea este încă parțial sub forma complexului cu P_1).

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Acest lucru se întâmplă atunci când chimotripsina hidrolizează un ester. Acilarea enzimei se se realizează rapid, în timp ce deacilarea nu are loc cu aceeaşi viteză. Situaţia este inversă în cazul hidrolizei amidelor. Cele consemnate mai sus reprezintă un exemplu când interpretarea superficială a valorii lui K_M poate conduce la concluzii eronate.

Abateri de la cinetica michaeliană

Nu toate enzimele cunoscute în prezent respectă cinetica Michaelis-Menten. De exemplu enzimele alosterice, enzime ce îndeplinesc în organismele vii un important rol de reglare a metabolismului, prezintă unele abateri de la cinetica michaeliană. Există de asemenea enzime a căror activitate catalitică scade progresiv odată cu creşterea concentraţiei substratului, dependenţa Michaelis-Menten fiind respectată doar în domeniul concentraţiilor mici. Acest fenomen poartă numele de ***inhibiţie prin substrat*** (fig. 89) şi poate fi explicată prin mai multe mecanisme:

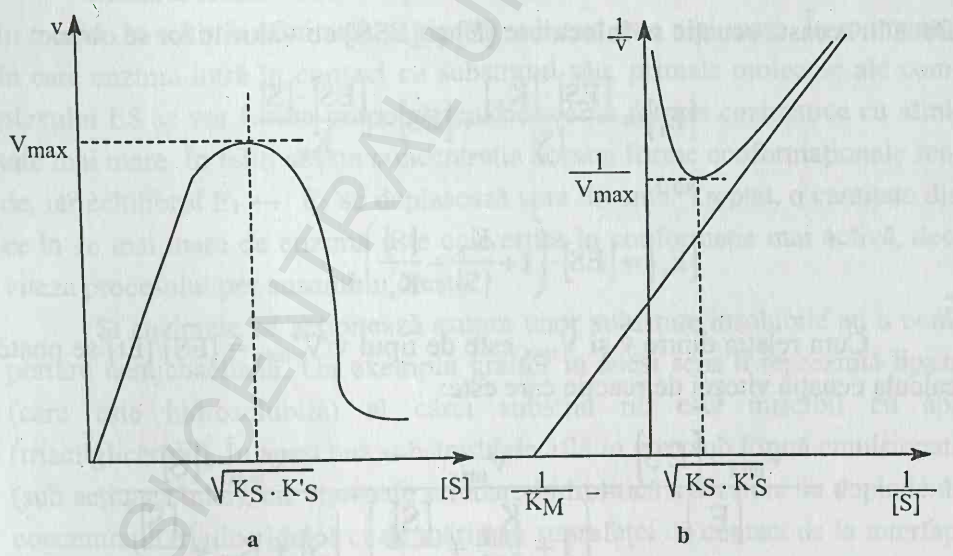


Fig. 89. Reprezentarea Michaelis-Menten (a) şi Lineweaver-Burk (b) pentru enzimele supuse inhibiţiei prin substrat

a) Pentru enzimele ce conţin în centrul activ două sau mai multe grupări reactive capabile să formeze separat interacţiuni cu diferiţi atomi ai

substratului, la valori mari ale concentrației acestuia se pot lega, la același situs catalitic mai multe molecule de substrat cu formarea unor ***complecși ES neproductivi.*** Reacțiile ce au loc în asemenea situații sunt de tipul:

$$E + S \underset{k_{-1}}{\overset{k_{+1}}{\rightleftharpoons}} ES \xrightarrow{k_{+2}} E + P$$

$$ES + S \rightleftharpoons ESS \xrightarrow{k'} E + P$$

în care $k' < k_{+2}$. Constantele de disociere pentru cei doi complecși sunt:

$$K_S = \frac{[E]\ [S]}{[ES]} \quad \text{și} \quad K'_S = \frac{[ES]\ [S]}{[ESS]}$$

În această situație, enzima din mediu poate exista sub trei forme:

$$[Et] = [E] + [ES] + [ESS]$$

Dacă în această ecuație se înlocuiesc [E] și [ESS] cu valorile lor se obține:

$$[E_t] = \frac{[ES]\cdot[K_S]}{[S]} + [ES] + \frac{[ES]\cdot[S]}{K'_S}$$

sau

$$[E_t] = [ES]\cdot\left(1 + \frac{K_S}{[S]} + \frac{[S]}{K'_S}\right)$$

Cum relația dintre v și V_{max} este de tipul $v/V'_{max} = [ES]/[Et]$ se poate calcula ecuația vitezei de reacție care este:

$$v = \frac{V'_{max}\cdot[ES]}{[E_t]} = \frac{V'_{max}}{\left(1 + \frac{K_S}{[S]} + \frac{[S]}{K'_S}\right)} = \frac{V'_{max}\cdot[S]}{[S] + K_S + \frac{[S]^2}{K'_S}}$$

Reprezentarea grafică a parametrului v în funcție de [s] are aspectul din figura 89

b) Dacă în afara situsului catalitic enzima mai conține și un al doilea situs capabil să lege substratul, la concentrații relativ crescute ale acestuia au

loc modificări ale conformației centrului activ deoarece substratul se fixează și pe acel situs. Această deformare a moleculei enzimatice determină diminuarea progresivă a capacității catalitice.

c) Scăderea activității enzimatice la concentrații mari de substrat se mai observă și în unele reacții cu două sau mai multe substrate, când unul din ei este inhibitor competitiv al celuilalt substrat.

d) În cazul hidrolazelor, apa poate fi considerată unul din substrate. La concentrații mari ale substratului propriu-zis scade „concentrația" apei care implicit diminuează viteza de reacție. Și în acest caz cinetica enzimatică este nemichaeliană.

Abaterile de la cinetica Michaelis-Menten presupun nu doar scăderea activității catalitice la concentrații mari de substrat. Există situații când mărirea concentrației substratului determină o accelerare a procesului catalitic. Acest fenomen poartă numele de ***activare prin substrat*** și se întâlnește în cazul enzimelor ce pot exista, la echilibru, în două conformații $E_1 \leftrightarrow E_2$ în care una din forme (de exemplu E_1) predomină cantitativ.

Cealaltă formă conformațională (E_2) are o concentrație mult mai mică în mediu, în schimb afinitatea sa pentru substrat este mai mare. În momentul în care enzima intră în contact cu substratul său, primele molecule ale complexului ES se vor forma preponderent pe seama formei enzimatice cu afinitate mai mare. În felul acesta concentrația acestei forme conformaționale scade, iar echilibrul $E_1 \leftrightarrow E_2$ se deplasează spre dreapta. Treptat, o cantitate din ce în ce mai mare de enzimă este convertită în conformația mai activă, deci viteza procesului per ansamblu crește.

Și enzimele ce acționează asupra unor substrate insolubile au o comportare nemichaeliană. Un exemplu grăitor în acest sens îl reprezintă lipaza (care este hidrosolubilă) al cărei substrat nu este miscibil cu apa (triacilglicerolii). În acest caz substratul de află *in vivo* sub formă emulsionată (sub acțiunea bilei), iar viteza de scindare hidrolitică a acestuia nu depinde de concentrația trigliceridelor ci de mărimea suprafeței de contact de la interfața celor două faze, deci de gradul de emulsionare.

Abateri de la cinetica Michaelis-Menten au loc și în cazul reacțiilor autocatalitice cum ar fi de exemplu procesul conversiei tripsinogenului în enzimă activă, când tripsina formată manifestă o acțiune de activare a procesului.

Reacții enzimatice cu două substrate.

Reacțiile enzimatice cu un singur substrat, un singur complex ES și un singur produs de reacție se întâlnesc mai rar, majoritatea transformărilor biochimice fiind reacții cu două sau chiar mai multe substrate. Studiul cineticii acestor reacții este mult mai dificil deoarece numărul speciilor moleculare existente în mediul de incubare la un moment dat este mult mai mare. În mod corespunzător și numărul parametrilor variabili este mai mare.

Pentru exprimarea matematică a reacțiilor cu două substrate, mulți autori (*Cleland, Hanes, Alberti et al.*) au făcut unele artificii de calcul, considerând viteza inițială de reacție ca o funcție a modificării concentrației unuia din cele două substrate, în condițiile în care concentrația celuilalt ar rămâne constantă.

Într-o reacție de tipul:

$$S_1 + S_2 \rightleftharpoons P_1 + P_2$$

pot fi luate în considerare două variante:

a) concentrația lui S_2 se consideră constantă deoarece $[S_2] >> [E_t]$, variind concentrația lui S_1;

b) când concentrația lui S_1 este mare ($[S_1] >> [E_t]$), aceasta se consideră constantă, variind concentrația lui S_2. În aceste condiții se obțin următoarele valori ale vitezelor de reacție:

$$v_{+1} = \frac{V_{max} \cdot [S_1] \cdot [S_2]}{K_{S_1} \cdot K_{M_2} + K_{M_2} \cdot [S_1] + K_{M_1} \cdot [S_2] + [S_1] \cdot [S_2]}$$

și respectiv:

$$v_{-1} = \frac{V'_{max} \cdot [P_1] \cdot [P_2]}{K_{P_2} \cdot K'_{M_1} + K'_{M_2} \cdot [P_1] + K'_{M_1} \cdot [P_2] + [P_1] \cdot [P_2]}$$

unde:

K_{S1} și K_{S2} - constantele de disociere ale complecșilor binari enzimă - substrat;

K_{M1} și K_{M2} - constantele Michaelis raportate la S_1 și S_2;

K'_{M1} și K'_{M2} - constantele Michaelis raportate la P_1 și P_2;

v_{+1} și v_{-1} - vitezele reacțiilor directă și respectiv inversă;

V_{max} și V'_{max} - vitezele maxime ale reacției directe, respectiv inverse.

Cele două ecuații pot fi prelucrate în modelul Lineweaver-Burk (valorile inverse) și reprezentate grafic considerând concentrația unui substrat constantă și luând în considerare un număr de concentrații diferite (de exemplu trei) ale celuilalt substrat (fig.90).

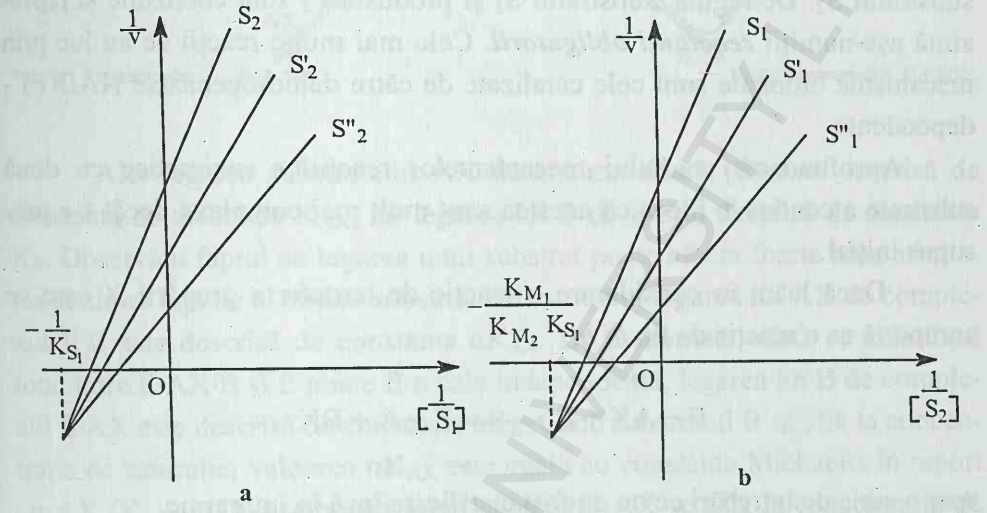
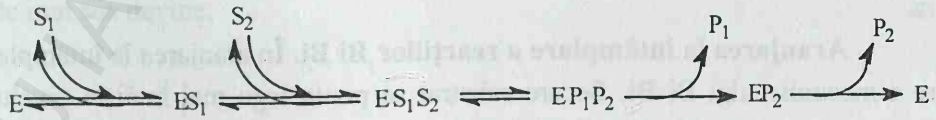


Fig. 90. Reprezentarea Lineweaver-Burk pentru o reacție cu două substrate când $[S_2]$=const. (a) și respectiv $[S_1]$=const. (b)

Mecanismul Bi-Bi ordonat

În primele etape ale studiului reacțiilor enzimatice s-a emis ipoteza că în majoritatea cazurilor, reacțiile enzimatice cu două substrate ar avea loc printr-un mecanism special: într-o primă fază, enzima formează cu unul din substrate un complex binar ES_1. Abia în faza următoare se fixează celălalt substrat cu formarea complexului ternar ES_1S_2, actul catalitic propriu-zis având loc la acest nivel. Urmează eliberarea unui produs P_1, apoi a celuilalt (P_2) și regenerarea enzimei:



Enzima are o mare afinitate pentru substratul S_1, atât în absența cât și în prezența substratului S_2 din care cauză se formează inițial complexul ES_1.

Față de substratul S_2 enzima nu prezintă afinitate, sau are o afinitate foarte mică, în schimb există o afinitate considerabilă între complexul ES_1 și substratul S_2. De regulă, substratul S_1 și produsul P_2 sunt coenzime și reprezintă așa-numiții ***reactanți obligatorii***. Cele mai multe reacții ce au loc prin mecanisme ordonate sunt cele catalizate de către dehidrogenazele $NAD(P)^+$-dependente.

Aprofundarea studiului mecanismelor reacțiilor enzimatice cu două substrate a condus la ideea că acestea sunt mult mai complexe decât s-a presupus inițial.

Dacă luăm în considerare o reacție de transfer a grupării X care se comportă ca o reacție de tip *bi bi*:

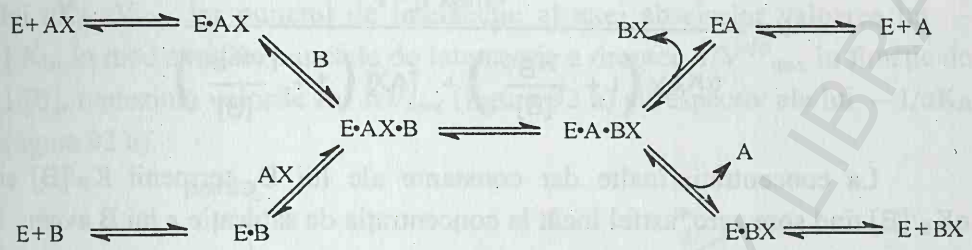
$$E + AX + B \longrightarrow E + A + BX$$

apar o serie de întrebări ce nu au fost clarificate încă în întregime.

O primă întrebare se referă la faptul dacă este posibil ca un substrat să poată fi legat (cu formarea complexului ES_1) și eliberarea lui sub forma produsului P_1 înainte ca al doilea substrat să se lege. Are loc transferul grupării X direct de la A la B, când ambele substrate se leagă la nivelul situsul – ului activ al enzimei, sau reacția continuă prin tranferul grupării X de la donorul A, la situs-ul enzimei, după care care se realizează un al doilea transfer al grupării de la situs-ul enzimei la acceptorul moleculei B?

Aceste neclarități presupun existența a cel puțin trei mecanisme pentru generalizarea schemei: mecanisme ce includ aranjarea întâmplatoare, obligatoriu ordonate și dubla – deplasare sau *mecanismul "Ping-Pong"*. Adesea, o dificultate majoră a măsurării kinetice constă în diferențierea între aceste mecanisme variate. Vom prezenta în cele ce urmează fiecare mecanism și vom face o descriere grafică a metodelor pentru a distingerea acestora.

Aranjarea la întâmplare a reacțiilor Bi Bi. În aranjarea la întâmplare a mecanismului Bi Bi, fiecare substrat se poate lega mai întâi la nivelul centrului activ al enzimei și fiecare produs poate fi apoi clivat. Indiferent care substrat se leagă mai întâi, reacția decurge direct spre un intermediar de tipul complexului E·AX·B:



Aici legarea substratului AX de enzima liberă (E) este descrisă de constanta de disociere K_{AX}, iar legarea lui B de E este descrisă de constanta K_B. Observăm faptul că legarea unui substrat poate afecta foarte bine afinitatea enzimei față de al doilea substrat. Prin urmare, legarea lui AX de complexul E·B este descrisă de constanta αK_{AX}. De asemenea, odată ce echilibrul total între E·AX·B şi E poate fi o cale independentă, legarea lui B de complexul E·AX este descrisă de constanta αK_B. Când substratul B se află la concentrația de saturație, valoarea αK_{AX} este egală cu constanta Michaelis în raport cu AX (K_{mAX}). De asemenea, când substratul AX se află la concentrația de saturație, $\alpha K_B = K_{mB}$, iar viteza fiecărei reacții enzimatice este data de ecuatia:

$$v = k_{cat}\,[E{\bullet}AX{\bullet}B] = \frac{k_{cat}\,[E_t][E{\bullet}AX{\bullet}B]}{[E1 + [E{\bullet}AX] + [E{\bullet}B] + [E{\bullet}AX{\bullet}B]}$$

Dacă exprimăm concentrația variatelor specii pe baza concentrației enzimei libere [E], obținem:

$$v = \frac{V_{max}\,[AX][B]}{\alpha\, K_{AX}K_B + \alpha K_B[AX] + \alpha K_{AX}[B] + [AX][B]}$$

Atunci când concentrația unuia din substrate este constantă (de exemplu [B] = constant şi [AX] variază), prin rearanjarea termenilor ecuația de mai sus devine:

$$v = \frac{V_{max}\,[AX]}{\alpha K_{AX}\left(1 + \frac{K_B}{[B]}\right) + [AX]\left(1 + \frac{\alpha K_B}{[B]}\right)}$$

La concentrații înalte dar constante ale lui B, termenii $K_B/[B]$ și $\alpha K_B/[B]$ tind spre zero, astfel încât la concentrația de saturație a lui B avem:

$$v = \frac{V_{max}^{app}\,[AX]}{K_{AX}^{app} + [AX]}$$

și, de asemenea, la concentrația de saturație a lui [AX] avem:

$$v = \frac{V_{max}^{app}\,[B]}{K_B^{app} + [B]}$$

Dacă măsurăm viteza de reacție într-un domeniu de concentrații ale lui AX și menținem cionstantă concentrația lui B, reprezentățile grafice ale valorilor inverse vor arăta ca un grup de linii care converg către partea stângă a axei 0y așa cum este ilustrat în figura 91.

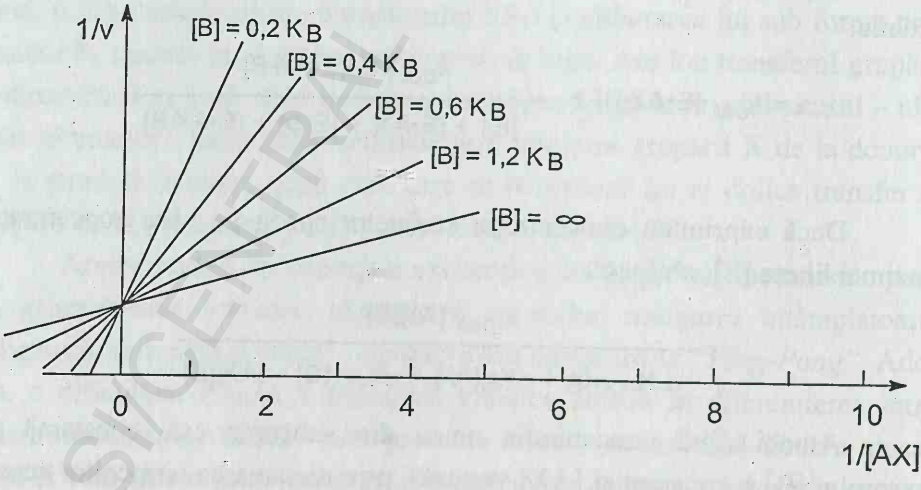


Fig. 91. Reprezentarea grafică a valorilor inverse (1/v în funcție de 1/[AX]) în reacțiile enzimatice realizate prin mecanism de tip Bi Bi (Copeland, R. A .- 2000)

Graficele din figura 92 (a) pot fi interpretate ca fiind drepte ce pleacă din punctul 1/[B], iar valorile de pe ordonată, (de ex. $1/V_{max}^{app}$) ca funcții de 1/[B].

Punctul de intersecția a dreptei cu axa ordonatelor reprezintă valoarea lui $\alpha K_{AX}/V_{max}$, iar punctul de intersecție al axei absciselor valoarea lui $-1/K_B$. În mod similar, punctele de intersecție a dreptei $1/V^{app}_{max}$ în funcție de 1/[B], reprezintă valorile lui $1/V_{max}$ (figura 92 a) şi respectiv ale lui $-1/\alpha K_B$ (figura 92 b).

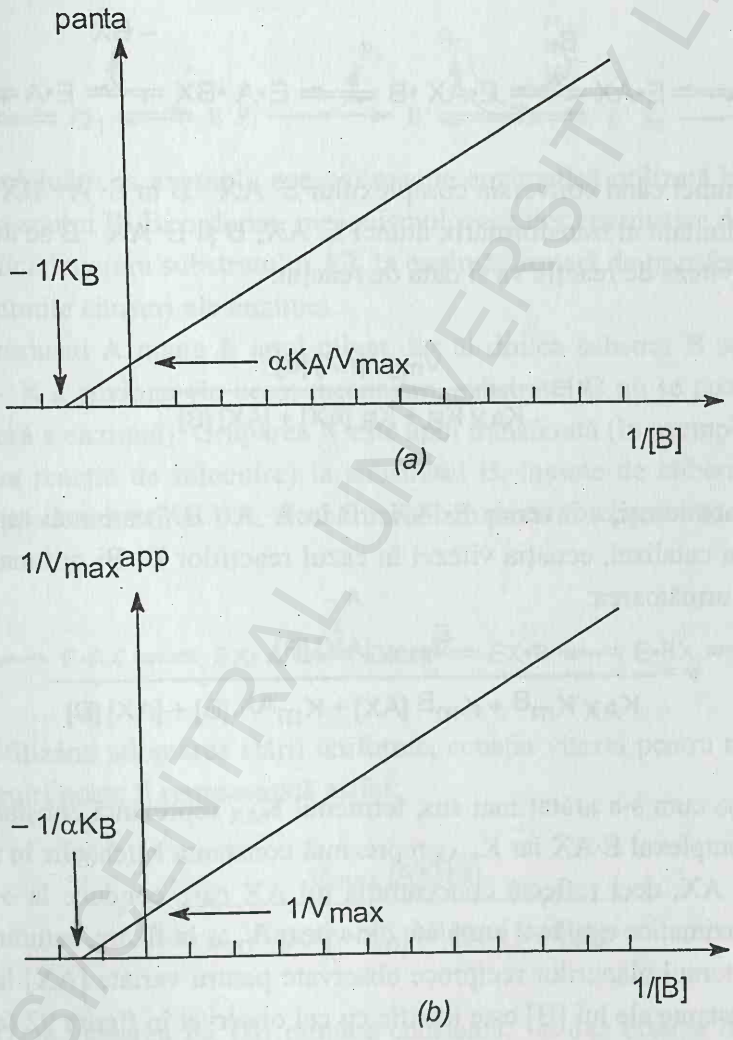
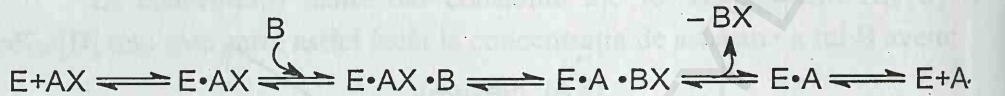


Fig. 92. Reprezentarea grafică a determinării constantelor K_{AX}, K_B, V_{max} pentru reacțiile enzimatice de tip Bi Bi la întâmplare (Copeland, R.A. – 2000)

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Mecanismul reacțiilor enzimatice de tip Bi Bi ordonat. În reacțiile Bi Bi de tip ordonat obligatoriu, unul din substrate, de exemplu AX, se leagă de enzime înainte ca alte substrate (B) să se lege. Ca şi în cazul reacțiilor de tip Bi Bi la întâmplare, mecanismul constă în formarea directă a unui intermediar conform schemei:



Atunci când conversia complexului E· AX · B în E· A · BX reprezintă factorul limitant al transformării, atunci E, AX, B şi E· AX · B se află în echilibru, iar viteza de reacție va fi data de reacția:

$$v = \frac{V_{max}\,[AX]\,[B]}{K_{AX}\,K_B + K_B\,[AX] + [AX]\,[B]}$$

Dacă totuşi, conversia E· AX · B în E· A · BX este mai rapidă decât alți paşi ai catalizei, ecuația vitezei în cazul reacțiilor Bi Bi ordonate obligatoriu este următoarea:

$$v = \frac{V_{max}\,[AX]\,[B]}{K_{AX}\,K_m^B + K_m^B\,[AX] + K_m^{AX}\,[B] + [AX]\,[B]}$$

Aşa cum s-a arătat mai sus, termenul K_{AX} reprezintă constanta în raport cu complexul E·AX iar K_{mAX} reprezintă constanta Michaelis în raport cu substratul AX, deci reflectă concentrația lui AX care conduce la o viteză a reacției enzimatice egală cu jumătate din viteza V_{max} la fixare, saturând [B].

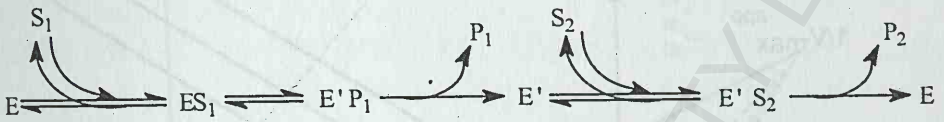
Paternul planurilor reciproce observate pentru variate [AX] la diferite valori constante ale lui [B] este identic cu cel observat în figura 92 (a) pentru reacția Bi Bi întâmplător ordonată.

Mecanismul Ping-Pong

Acest tip de mecanism enzimatic se întâlneşte în cazul reacțiilor cu două substrate atunci când enzima suferă o serie de modificări chimice reversi-

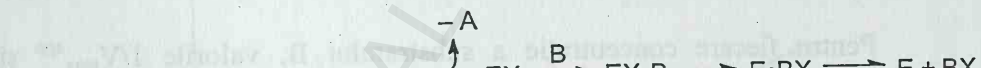
BCU IAŞI CENTRALA UNIVERSITARĂ LIBRARY

bile într-una din fazele procesului. În prima etapă are loc formarea complexului binar ES_1 care se scindează generând produsul P_1 şi enzima modificată (E'). Sub această formă modificată enzima acţionează asupra celuilalt substrat când formează tot un complex binar (ES_2) care generează produsul P_2 şi forma iniţială a enzimei:



Dacă luăm ca exemplu aceeaşi reacţie enzimatică utilizată la explicarea mecanismului Bi Bi ordonat, mecanismul reacţiilor enzimatice de tip Ping Pong implică legarea substratului AX la enzimă, urmată de transferul grupării X la anumite situsuri ale enzimei.

Produsul A poate fi apoi clivat, iar al doilea substrat B se leagă la forma E – X a enzimei (în acest mecanism, substratul B nu se poate lega la forma liberă a enzimei). Gruparea X este apoi transferată (în exemplul de mai sus a doua reacţie de înlocuire) la substratul B, înainte de eliberarea de la enzimă a produsului final BX. Acest mecanism poate fi reprezentat schematic astfel:



Utilizând adoptarea stării uniforme, ecuaţia vitezei pentru reacţia dublei înlocuiri poate fi reprezentată astfel:

$$v = \frac{V_{max}\,[AX]\,[B]}{K_m^{B}\,[AX] + K_m^{AX}\,[B] + [AX]\,[B]}$$

Dacă valoarea lui [B] rămâne constantă, atunci ecuaţia de mai sus pentru variabilă [AX] devine:

$$v = \frac{V_{max}\,[AX]}{K_m^{AX} + [AX]\left(1 + \frac{K_m^{B}}{[B]}\right)}$$

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Reciprocele ce descriu reacția care corespunde mecanismului dublei înlocuiri pentru variația concentrațiilor substratului AX la mai multe concentrații fixe a substratului B reprezintă linii parale (fig. 93).

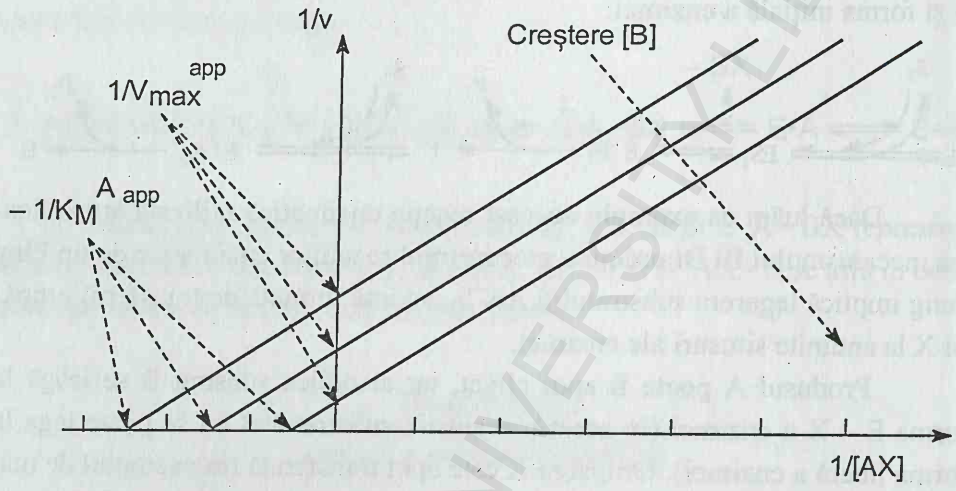


Fig. 93. Reprezentarea grafică a valorilor inverse (1/v în funcție de 1/[AX]) pentru reacțiile enzimatice ce decurg prin mecanismul dublei înlocuiri Bi Bi (mecanism de tip Ping-Pong) (Copeland, R.A. – 2000)

Pentru fiecare concentrație a substratului B, valorile $1/V_{max}^{app}$ și $-1/K_m^{AX \cdot app}$ pot fi determinate pe axele 0x si 0y. Datele conținute în figura 93 pot fi reprezentați prin temenii $1/V_{max}^{app}$ ca funcție 1/[B] și $1/K_m^{AX \cdot app}$ (fig. 94).

Enzimele ce acționează prin acest mecanism prezintă afinități diferite pentru cele două substrate, fie separat, fie unul în prezența celuilalt. Acest mecanism cinetic este caracteristic, de exemplu, enzimelor piridoxalfosfat-dependente și flavoenzimelor.

În cazul reacțiilor de transaminare de exemplu, aminotransferaza respectivă, care este piridoxalfosfat-dependentă, acționează mai întâi cu aminoacidul substrat (vezi cap.III.4.3) formând complexul ES_1 care este o aldimină. Aceasta trece apoi în cetimină și apoi generează cetoacidul (P_1) și enzima modificată (enzima activă este sub forma apoenzimă-PALP, trecând în forma apoenzimă-PAMP după generarea cetoacidului). Sub această formă, enzima acționează apoi asupra celuilalt substrat (cetoacidul substrat), iar după

eliberarea aminoacidului produs (P_2) se regenerează în forma ei inițială (apoenzimă-PALP).

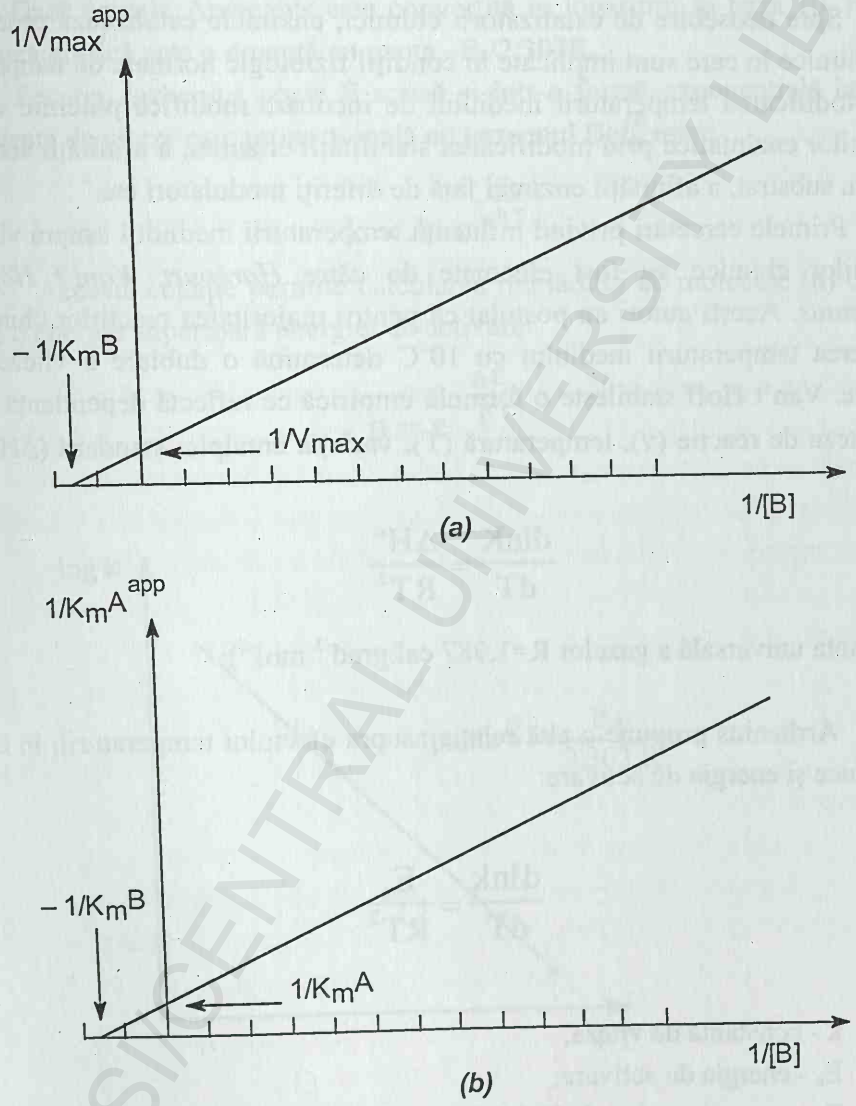


Fig. 94. Reprezentarea grafică în sistemul de axe rectangulare $1/M_{max}^{app}$ în funcție de 1/[B] (a) și respectiv $1/K_m^{app}$ în funcție de 1[B] (b) a valorilor parametrilor K_M^{AX}, K_m^B și V_{max} pentru reacțiile enzimatice ce decurg prin mecanismul Pig-Pong (Copeland, R.A. – 2000)

BCU IAȘI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

IV.2.3 Influența temperaturii mediului asupra vitezei reacțiilor enzimatice

Spre deosebire de catalizatorii chimici, enzimele catalizează procesele biochimice în care sunt implicate în condiții fiziologic normale de temperatură. Modificarea temperaturii mediului de incubare modifică puternic viteza reacțiilor enzimatice prin modificarea stabilității enzimei, a afinității acesteia pentru substrat, a afinității enzimei față de diferiți modulatori etc.

Primele cercetări privind influența temperaturii mediului asupra vitezei reacțiilor chimice au fost efectuate de către *Harcourt, Vant't Hoff* şi *Arrhenius*. Aceşti autori au postulat că pentru majoritatea reacțiilor chimice, creşterea temperaturii mediului cu 10°C determină o dublare a vitezei de reacție. Van't Hoff stabileşte o formulă empirică ce reflectă dependența dintre viteza de reacție (v), temperatură (T), variația entalpiei standard (ΔH°) şi

$$\frac{d\ln K}{dT} = \frac{\Delta H^\circ}{RT^2}$$

constanta universală a gazelor R=1,987 cal.grad^{-1}.mol^{-1}):

Arrhenius propune o altă relație asupra efectului temperaturii, în care introduce şi energia de activare:

$$\frac{d\ln k}{dT} = \frac{E_a}{RT^2}$$

unde:

k - constanta de viteză;

E_a - energia de activare;

T - temperatura (grade Kelvin);

R - constanta universală a gazelor.

Integrând această relație în funcție de T rezultă:

$$\ln k = \ln A - \frac{E_a}{RT^2}$$

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

în care A este o constantă ce rezultă prin integrare şi se numeşte ***factor de frecvenţă***. Reprezentarea grafică a acestei ecuaţii (luând pe ordonată ln k, iar pe abscisă 1/T) permite determinarea energiei de activare (fig. 95).

Dacă ecuaţia Arrhenius este convertită în logaritmi în baza 10, reprezentarea grafică este o dreaptă cu panta $-E_a/2{,}303R$.

Ecuaţia Arrhenius poate fi scrisă şi într-o formă exponenţială în care constanta de viteză este proporţională cu termenul Boltzman:

$$k = A \cdot e^{-\frac{E_a}{RT}}$$

Această ecuaţie permite calcularea numărului de molecule (n) ce posedă o energie superioară energiei de activare:

$$n = e^{-\frac{\Delta E_a}{RT}}$$

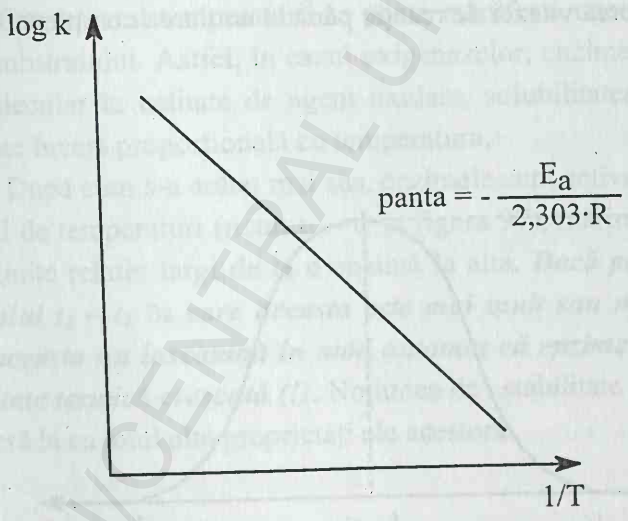


Fig. 95. Reprezentarea grafică a ecuaţiei Arrhenius (sub forma logaritmilor zecimali)

Din considerente practice, efectul temperaturii asupra reacţiilor enzimatice se exprimă sub forma ***coeficientului de temperatură*** Q_{10} care indică

creşterea vitezei de reacţie cauzată de mărirea cu 10°C a temperaturii mediului de incubare:

$$E_a = \frac{RT^2 \log Q_{10}}{T_2 - T_1}$$

Spre deosebire de catalizatorii chimici, modificarea temperaturii mediului determină o modificare puternică a activităţii catalitice a enzimelor. Pentru marea majoritate a acestora, reprezentarea grafică a vitezei de reacţie în funcţie de temperatură are aspectul unui clopot, activitatea maximă înregistrându-se la o temperatură dată, numită ***temperatură optimă de acţiune*** (fig. 96).

La temperaturi scăzute, viteza reacţiilor enzimatice este nulă, activitatea catalitică începând să se manifeste la o temperatură dată (t_1). Odată cu creşterea temperaturii se înregistrează o creştere a vitezei de reacţie care este maximă la temperatura optimă de acţiune. Creşterea în continuare a temperaturii determină scăderea vitezei de reacţie până la anularea completă.

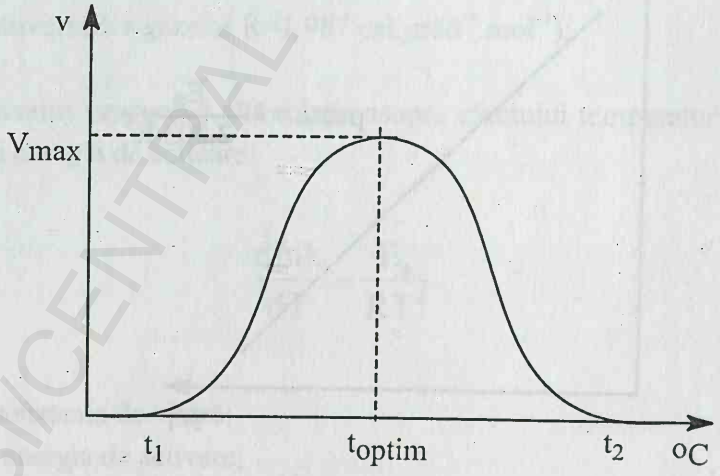


Fig. 96. Dependenţa vitezei reacţiilor enzimatice de temperatura mediului de incubare

Atât temperatura optimă de acţiune cât şi intervalul termic t_1-t_2 sunt extrem de diferite şi depind, în primul rând de sursa enzimei. Astfel, pentru enzimele din ţesuturile animale cu sânge cald, temperatura optimă se situează

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

în jurul valorii de 37°C, iar intervalul termic t_1-t_2 este, în general, foarte restrâns. Pentru enzimele de origine vegetală şi microbiană, temperatura optimă de acţiune este reprezentată, de fapt, de un interval termic (20-30°C) iar intervalul t_1-t_2 este mult mai larg.

Există şi multe excepţii de la această regulă. De exemplu enzimele organismelor vii din apele termale sau ale microorganismelor din gheţari au temperaturi optime de acţiune mult mai crescute (50-70°C şi chiar peste 100°C) şi respectiv foarte scăzute (0-10°C şi chiar temperaturi negative).

Efectul diferit al temperaturii asupra reacţiilor enzimatice comparativ cu cele chimice se explică printr-o multitudine de fenomene ce apar în cataliza enzimatică. Astfel, modificarea temperaturii mediului de incubare poate determina o modificare mai mult sau mai puţin profundă a structurii enzimei, a stabilităţii complexului enzimă – substrat, a gradului de ionizare al grupelor funcţionale din structura enzimei etc.

Alte efecte se referă la micromediul ce înconjoară macromolecula de protein-enzimă cum ar fi capacitatea de a traversa faza lipidică a membranelor. În fine, efectul temperaturii se poate manifesta uneori şi asupra concentraţiei substratului. Astfel, în cazul oxigenazelor, enzime ce utilizează oxigenul molecular în calitate de agent oxidant, solubilitatea acestuia în mediul apos este invers proporţională cu temperatura.

După cum s-a arătat mai sus, enzimele sunt active doar într-un anumit interval de temperaturi (notat $t_1 - t_2$ în figura 97), mărimea acestuia oscilând între limite relativ largi de la o enzimă la alta. ***Dacă pentru o enzimă dată intervalul $t_1 - t_2$ în care aceasta este mai mult sau mai puţin activă este larg, aceasta nu înseamnă în mod automat că enzima în cauză prezintă o stabilitate termică crescută (!)***. Noţiunea de „stabilitate termică" a enzimelor se referă la cu totul alte proprietăţi ale acestora.

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

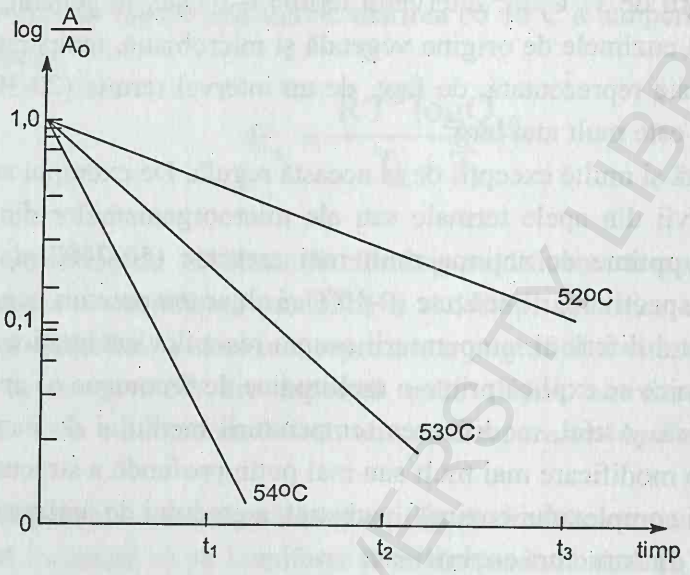


Fig. 97. Scăderea activității enzimelor prin stocare la temperaturi apropiate de temperatura de denaturare.

Gradul de stabilitate termică al unei enzime date se referă la intervalul de timp în care enzima respectivă poate fi stocată la o temperatură apropiată de cea de denaturare, fără a avea loc o diminuare apreciabilă a capacității sale catalitice. Evaluarea stabilității (sau invers, a labilității) termice a unei enzime se poate realiza experimental prin stocarea enzimei respective la o temperatură apropiată de temperatura de denaturare.

Să presupunem în mod convențional că o anumită enzimă, a cărei activitate inițială este A_0, se denaturează la 60°C. Se iau mai multe eşantioane din enzima respectivă şi se stochează în termostate diferite, reglate la 52°, 53° şi respectiv 54°C. Periodic (de exemplu la fiecare 60 de minute sau la fiecare 24 de ore) se iau probe din fiecare eşantion şi se determină activitatea catalitică în condiții optime de pH, temperatură, concentrație a enzimei şi substratului, tărie ionică etc., condiții absolut identice pentru fiecare din cele trei probe. Evident că încălzirea va determina o diminuare mai mult sau mai puțin accentuată a vitezei de reacție, activitatea remanentă fiind A ($A < A_o$). Viteza de descreştere a activității enzimatice în timp, sub efectul temperaturii, este dată de relația:

$$\frac{dA}{dt} = -k \cdot A$$

sau:

$$\log \frac{A}{A_o} = -k \cdot t$$

unde k este o constantă caracteristică fiecărei enzime şi depinde de temperatura de stocare. Reprezentarea grafică a lui $\log A/A_o$ în funcție de timp dă o dreaptă cu panta – k (fig. 97). Constanta k depinde de temperatură, iar unitatea de măsură este inversul unității de timp (min^{-1}).

Dacă se reprezintă grafic dependența dintre valoarea constantei k şi inversul temperaturii de stocare se obține graficul Arrhenius (fig. 98).

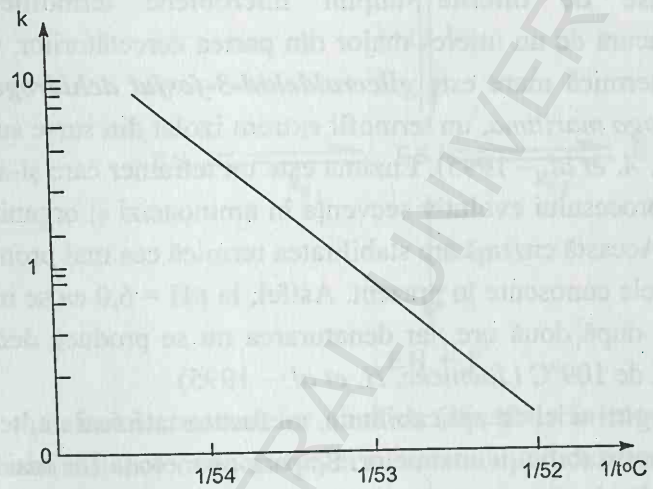


Fig. 98. Graficul Arrhenius în cazul enzimelor stocate la temperaturi apropiate de temperatura de denaturare

Din exemplele convenționale luate mai sus se observă că panta graficului din figura 96 conduce la o constantă k de ordinul I care se modifică foarte puternic la modificarea temperaturii. Acest fenomen este tipic pentru denaturarea proteinelor. Din reprezentarea Arrhenius (fig. 97) se observă că panta graficului este foarte mare. Energia de activare calculată în experimente de acest tip este, de cele mai multe ori, foarte mare (150 – 200 kJ/mol), iar denaturarea proteinei este un proces tipic endotermic ($\Delta H > 0$) care este însoțit de o variație pozitivă a entropiei ($\Delta S > 0$). În cazul în care temperatura creşte, termenul $T \cdot \Delta S$ creşte de asemenea, fiind vorba deci de o dependență directă.

BCU CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Din exemplul empiric analizat se poate concluziona că stabilitatea termică a unei enzime este cu atât mai mare cu cât termenul $T \cdot \Delta S$ este mai mic şi invers. Altfel spus, o enzimă este cu atât mai stabilă termic cu cât diminuarea capacităţii sale catalitice se face mai lent în cazul stocării la temperaturi apropiate valoric de temperatura de denaturare.

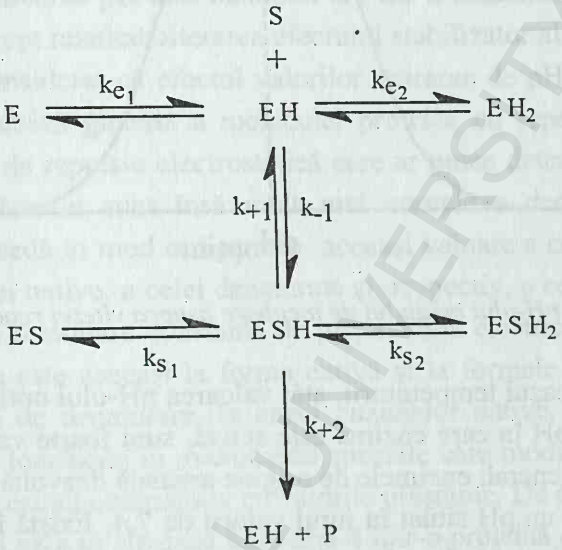
Problema stabilităţii termice a enzimelor, deşi cunoscută de mult timp, a redevenit actuală în urma descoperirii unor microorganisme capabile să se dezvolte în condiţii extreme de temperatură. Cercetările au fost orientate spre studiul echipamentelor enzimatice ale bacteriilor termofile extreme (sau hipertermofile). Datorită implicaţiilor practice deosebite, studiul enzimelor termostabile produse de diferite tulpini microbiene termofile sau termotolerante se bucură de un interes major din partea cercetătorilor. O enzimă cu stabilitate termică mare este ***gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza*** produsă de *Thermotoga maritima*, un termofil extrem izolat din surse submarine tropicale (*Wrba, A. et al.* – 1995). Enzima este un tetramer care şi-a conservat pe parcursul procesului evolutiv secvenţa în aminoacizi şi organizarea structurală spaţială. Această enzimă are stabilitatea termică cea mai pronunţată dintre toate enzimele cunoscute în prezent. Astfel, la pH = 6,0 ea se inactivează la 100°C abia după două ore, iar denaturarea nu se produce decât la temperaturi mai mari de 109°C (*Jaenicke, H. et al.* – 1995).

În vederea lărgirii ariei de aplicabilitate, au fost testate mai multe metode de creştere a termostabilităţii enzimelor. Se pare că metoda cea mai convenabilă o constituie fixarea acestora pe diferite suporturi insolubile cu obţinerea de biocatalizatori heterogeni cunoscuţi sub numele de ***enzime imobilizate***. Creşterea stabilităţii termice în acest caz se explică prin modificarea caracteristicilor fizico-chimice ale mediului în care enzimele respective funcţionează. În afară de creşterea termostabilităţii, enzimele imobilizate mai prezintă şi numeroase alte avantaje practice comparativ cu enzimele native (vezi cap. IX).

IV.2.4 Influenţa pH-ului mediului asupra vitezei reacţiilor enzimatice

Ca şi în cazul temperaturii, reacţia mediului manifestă o acţiune extrem de puternică asupra activităţii catalitice a enzimelor. Astfel, pH-ul mediului de reacţie poate afecta activitatea enzimelor fie ireversibil (când are loc

denaturarea lor la valori extreme ale acestui parametru fizico-chimic, fie reversibil când este influențat gradul de ionizare a enzimei, substratului, complexului ES sau al tuturor acestor specii moleculare. Dacă se consideră că aceste specii moleculare pot exista sub trei forme protonate, în funcție de pH-ul mediului şi că doar o formă a enzimei este activă, reacția enzimatică cu un singur substrat poate fi reprezentată schematic astfel:



Calculul constantelor cinetice (efectuate în mod similar ca în cazul studiului influenței concentrației substratului, adică prin descrierea constantelor şi înlocuirea acestora cu valorile lor în ecuația de viteză) conduc la o formulă ce determină pH-ul optim de acțiune:

$$pH_{optim} = \frac{pK_{e_{S_1}} + pK_{e_{S_2}}}{2}$$

Reprezentarea grafică a vitezei reacțiilor enzimatice de pH-ul mediului este, ca şi în cazul efectului termic, o curbă gaussiană, în care viteza maximă de reacție se obține la ***pH-ul optim de acțiune*** (fig. 99).

BCU IAȘI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

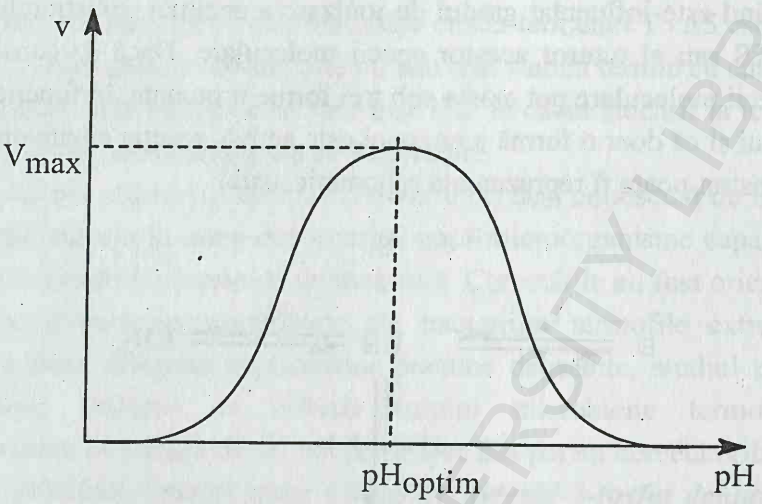


Fig. 99. Influența pH-ului mediului de incubare asupra vitezei reacțiilor enzimatice

Ca și în cazul temperaturii, atât valoarea pH-ului optim de acțiune cât și intervalul de pH în care enzima este activă, sunt foarte variate de la o enzimă la alta. În general, enzimele de origine animală dezvoltă activitatea catalitică maximă la un pH situat în jurul valorii de 7,4. Există însă și unele excepții când pH-ul optim de acțiune se situează în zona acidă sau chiar puternic acidă sau în zona alcalină. De exemplu pepsina gastrică este activă în intervalul de pH 1,5-4,0 cu un maxim de activitate în jurul valorii pH=1,8. În acest interval de pH, majoritatea enzimelor nu numai că sunt inactive dar pot fi chiar denaturate. Multe enzime sunt active în zona alcalină. De exemplu, pH-ul optim de acțiune pentru arginaza tisulară este situat în jurul valorii de 10,0, temperatură extremă la care alte enzime se inactivează.

Pentru transformările enzimatice reversibile, efectul pH-ului poate fi uneori diferit pentru reacția directă și reacția inversă, iar pH-ul optim de acțiune poate fi în astfel de situații, de asemenea diferit. Studiul dinamicii parametrilor cinetici ai unei enzime în funcție de pH-ul mediului este foarte des utilizat la studiul enzimelor ce conțin în structura situsului lor catalitic grupe funcționale ionizabile. Aceste grupări polare pot fi identificate și prin studiul dependenței vitezei de reacție de pH-ul mediului de incubare.

Această dependență strictă a capacității catalitice a enzimelor de pH-ul mediului de incubare are numeroase implicații practice. Cea mai des întâl-

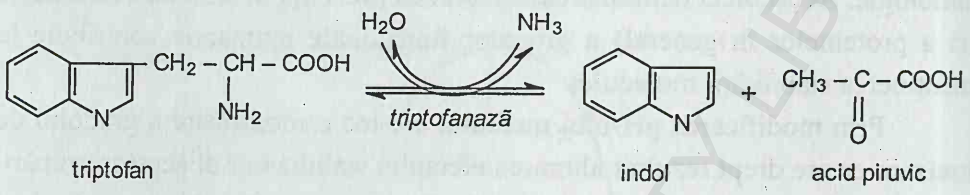
nită este stoparea activității enzimatice prin modificarea bruscă a reacției mediului. Astfel, denaturarea enzimelor în mediu acid (creat prin adăugare de HCl, acid tricloracetic, acid percloric etc.) se utilizează în mod curent în enzimologie. Acest efect demonstrează faptul că prezența în structura enzimelor (și a proteinelor în general) a grupelor funcționale ionizabile contribuie la menținerea stabilității moleculei.

Prin modificarea pH-ului mediului are loc o modificare a gradului de ionizare ce are drept rezultat alterarea efectului stabilizator al acestor grupări. Mult timp s-a considerat că efectul valorilor extreme de pH este acela de a mări sarcina electrică globală a moleculei proteice cu repercusiuni asupra creșterii forțelor de repulsie electrostatică care ar putea determina disocierea moleculei. Problemele sunt însă mult mai complexe deoarece situsurile ionizabile nu posedă în mod obligatoriu aceeași valoare a constantei pKa în molecula enzimei native, a celei denaturate și, respectiv, a celei parțial denaturate. Astfel, la o valoare constantă de pH, sarcina electrică globală a unei proteine date nu este aceeași la forma nativă și la formele corespunzătoare diferitelor stadii de denaturare. În cazul enzimelor native, unele resturi de aminoacizi sunt localizate în micromedii speciale care modifică puternic valorile pKa ale acestora comparativ cu valorile obișnuite. De exemplu, o grupă –COOH al cărei pKa se situează între 3 și 4 într-o proteină denaturată, poate avea valori ale acestei constante cuprinse între 5 și 6, sau chiar mai mari în cazul aceleiași proteine aflată în forma sa nativă. Se consideră că tocmai acest fenomen este responsabil, în cea mai mare parte, de efectele pe care le manifestă valorile extreme de pH asupra proteinelor deoarece alterarea, chiar și parțială, a structurilor superioare poate determina o modificare bruscă a gradului de ionizare (*Yang, A.S. et al.* – 1992).

In vitro, realizarea condițiilor optime de pH pentru efectuarea unei transformări enzimatice se face cu ajutorul soluțiilor tampon. Alegerea tamponului adecvat este esențială nu numai pentru crearea pH-ului optim ci și datorită faptului că ionii existenți în soluțiile tampon pot da diferite interacțiuni secundare cu moleculele protein-enzimelor.

Interpretarea acțiunii pH-ului mediului asupra activității enzimelor este, de foarte multe ori, extrem de dificilă. Pentru argumentarea acestei afirmații putem lua ca exemplu ***triptofanaza*** (***L-triptofan indol-liaza***, E.C. – 4.1.99.1) sintetizată de *Escherichia coli*, o enzimă ce conține piridoxalfosfatul în calitate de cofactor și care este activată în prezența ionilor de pota-

siu. Reacția catalizată de triptofanază constă în hidroliza triptofanului cu formare de indol, acid piruvic şi amoniac:



Atunci când echilibrul este deplasat spre dreapta (în sensul formării indolului), reacția este o β,γ – eliminare, iar triptofanaza acționează preponderent în acest sens. Teoretic, reacția de mai sus este reversibilă, enzima putând sintetiza triptofanul plecând de la indol, piruvat şi amoniac (*Marino, S.* – 1974). În vederea studierii efectului pH-ului asupra activității triptofanazei, mai exact a celor două reacții catalizate de această enzimă, a fost determinată activitatea de degradare a triptofanului (curba A) şi respectiv de sinteză a acestui aminoacid plecând de la piruvat, indol şi amoniac (curba B) la diferite valori de pH (fig. 100).

Deoarece activitatea enzimatică în sensul sintezei triptofanului este net inferioară celei înregistrate în reacția directă, de degradare, s-au calculat activitățile obținute în procente din valoarea maximă. Studiul graficelor arată un pH optim de acțiune de 8,3 în primul caz şi respectiv 8,8 în cazul reacției inverse.

Dacă această reacție ar fi efectiv reversibilă ar trebui ca pH-ul optim să fie acelaşi pentru ambele sensuri atâta timp cât mecanismul de acțiune şi centrul activ sunt aceleaşi. Diferența înregistrată demonstrează faptul că mai intervine un factor suplimentar legat de afinitatea enzimei față de substrate. Astfel, valoarea K_M a enzimei în raport cu cationii NH_4^+ la pH = 8,5 este de 300 mM însă adevăratul substrat pentru reacția inversă nu este cationul NH_4^+ ci NH_3. Dar deprotonarea cationului amoniu se poate realiza la pH < 8,0 când însă scade drastic concentrația amoniacului. Această inhibiție aparentă este datorată deci diminuării pronunțate a concentrației unuia din substrate.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

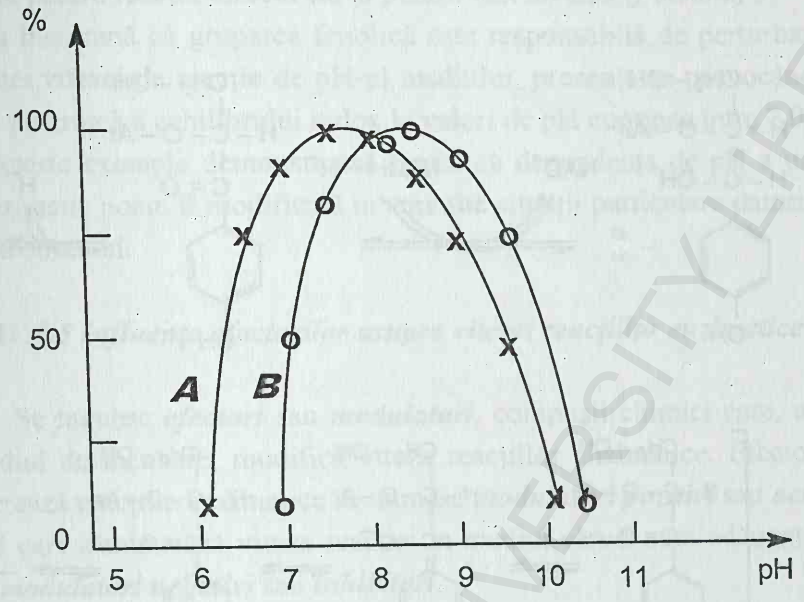
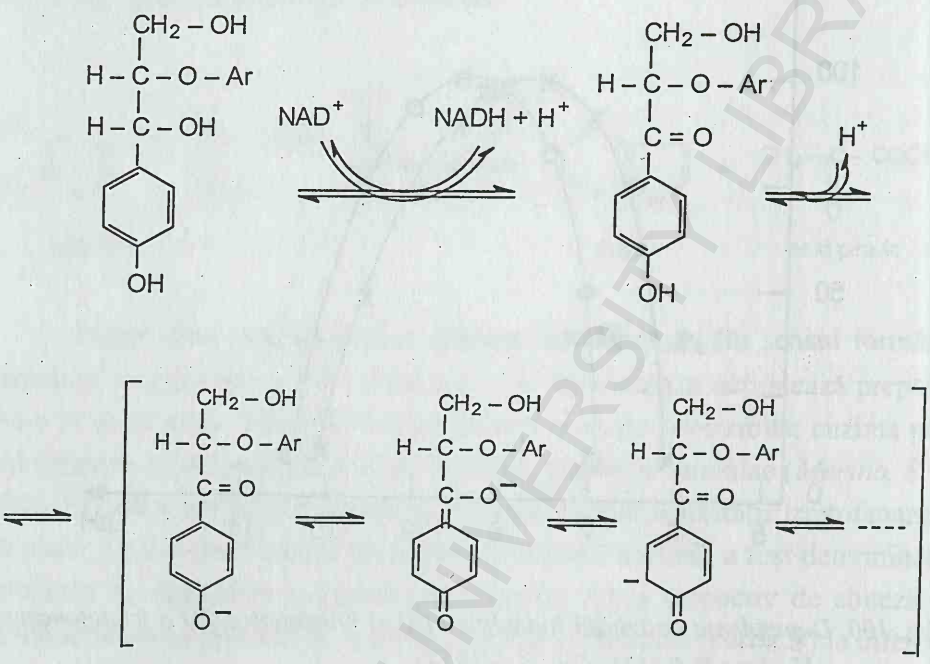


Fig. 100. Dependența activității hidrolitice (A) și biosintetice (B) a triptofanazei de pH-ul mediului (Marino, S. – 1974)

Afinitatea enzimei față de substrat este deci mult mai mică în cazul reacției inverse, iar activitatea catalitică crește doar ca urmare a asigurării unor concentrații apreciabile de substrat. Această diferență de afinitate se accentuează la valori de pH < 9,0. De aceea, curba B din figura 100, în ramura din domeniul acid, nu reflectă activitatea catalitică reală.

Un asemenea fenomen nu este însă singular în enzimologie, fiind întâlnit de exemplu în cazul unei dehidrogenaze microbiene ce a fost studiată prin utilizarea în calitate de substrat a unui derivat al guaiacolului (eterul guaiacil-glicerol-β-O-guaiacil). Reacția este reversibilă, iar la pH neutru echilibrul este deplasat în sensul generării formei cetonice (deci în sensul dehidrogenării grupării alcoolice secundare):

BCU IAȘI CAROL I UNIVERSITY LIBRARY



Apariția grupei funcționale cetonice în apropierea nucleului aromatic favorizează deprotonarea grupării fenolice. Gruparea cetonică fiind conjugată, determină delocalizarea sarcinii electrice negative a ionului fenolat, fapt ce creează o stare energetică favorabilă. Drept urmare, creşterea valorii pH-ului favorizează reacția de oxidare cu formarea cetonei corespunzătoare deoarece este facilitată deprotonarea grupării fenolice a cărei constantă de aciditate pK_a scade de la 9,5 la 7,4 după oxidare.

În situația inversă când mediul se acidifiază (deci la pH mic) este favorizată protonarea grupei fenolice, ceea ce are drept consecință reducerea grupei cetonice. Realizarea aceste transformări în sensul oxidării grupei alcoolice secundare în prezență de NAD^+ este favorizată la pH alcalin, pH-ul optim aparent fiind de 9,0 sau chiar mai mare. Reacția inversă însă, de reducere a grupei cetonice în prezență de NADH este favorizată la pH $\leq$ 7,0. De aceea, atât într-un caz cât şi în celălalt, viteza inițială de reacție nu se caracterizează prin acelaşi pH optim.

Din fericire, această reacție poate fi realizată şi prin utilizarea unui analog al substratului ce nu conține gruparea fenolică când se constată că valoarea reală a pH-ului optim de acțiune se situează între 7,0 şi 9,0 şi este ace-

eaşi, atât pentru reacţia directă cât şi pentru cea inversă (*Pelmont, J.* – 1995). Aceasta înseamnă că gruparea fenolică este responsabilă de perturbarea dependenţei vitezei de reacţie de pH-ul mediului, prezenţa sa provocând o deplasare puternică a echilibrului redox la valori de pH cuprinse între 7,0 şi 9.0.

Aceste exemple demonstrează faptul că dependenţa de pH a unui sistem enzimatic poate fi modificată în anumite situaţii particulare datorită ionizării substratului.

IV.2.5 Influenţa efectorilor asupra vitezei reacţiilor enzimatice

Se numesc ***efectori*** sau ***modulatori***, compuşii chimici care, adăugaţi în mediul de incubare, modifică viteza reacţiilor enzimatice. Efectorii care accelerează reacţiile enzimatice se numesc ***modulatori pozitivi*** sau ***activatori***, iar cei care diminuează viteza reacţiei în mediul căreia sunt adăugaţi se numesc ***modulatori negativi*** sau ***inhibitori***.

Rolul de activatori poate fi îndeplinit de diferiţi ioni metalici (molibden, mangan, magneziu, fier, zinc etc.), unii anioni anorganici (Cl^-) sau unii compuşi organici. În privinţa rolului activator al unor ioni metalici, trebuie făcută o distincţie netă între ***enzime activate de metale*** şi ***metaloenzime***. Din prima categorie fac parte acele enzime (ce pot fi mono– sau bicomponente) care catalizează anumite reacţii biochimice cu o viteză mai mare, în prezenţa unor ioni metalici decât în absenţa lor.

De exemplu, activitatea ATP-azei este mult mai mare atunci când mediul de reacţie conţine ioni de magneziu într-un raport Mg^{2+}:ATP=1:1. S-a constatat în acest caz că ionii metalici formează cu substratul complecşi Mg^{2+}-ATP a căror afinitate faţă de situsul catalitic al enzimei este mult mai mare decât a moleculelor de ATP libere. În a doua categorie (metaloenzime) intră acele enzime ce conţin în molecula lor unul sau mai mulţi ioni metalici, aceştia intrând de regulă în structura centrului activ, făcând deci parte din structura macromoleculei de protein-enzimă.

Din punct de vedere cinetic mai importanţi sunt inhibitorii, aceştia având un rol bine determinat în reglarea procesului metabolic. Şi din punct de vedere fundamental studiul inhibitorilor enzimatici este extrem de important, în primul rând pentru elucidarea structurii centrului activ al enzimei respective. În funcţie de modul lor de acţiune, inhibitorii enzimatici se clasifică în două grupe principale:

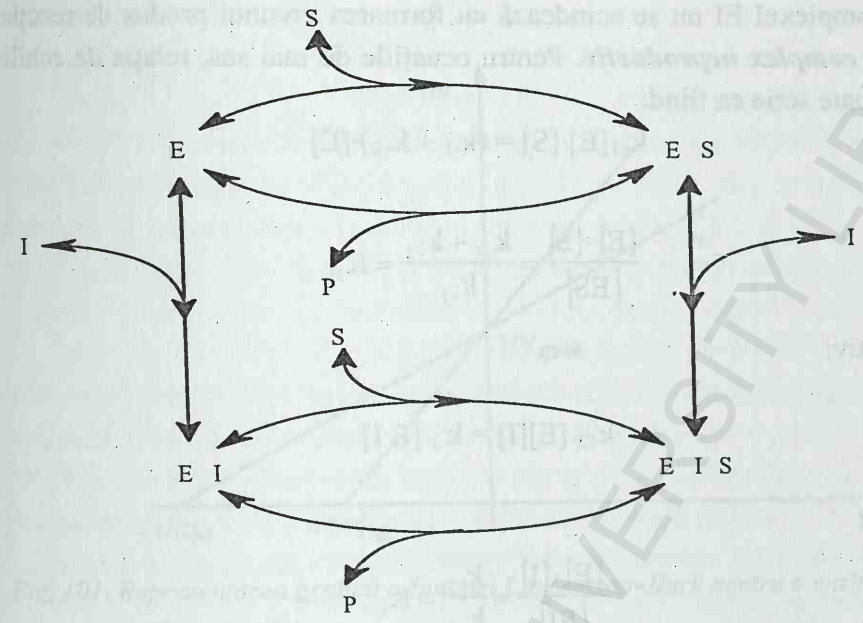
a) ***inhibitori ireversibili*** cunoscuți și sub denumirea de ***otrăvuri catalitice***, au o importanță mai mică pentru cinetica enzimatică. Aceştia se leagă preponderent prin legături puternice, covalente, de anumite resturi de aminoacizi esențiale pentru activitatea catalitică. În urma interacțiunii acestor inhibitori cu enzimele se formează complecşi stabili, inactivi din punct de vedere catalitic, inhibitorul neputând fi îndepărtat prin metode fizico-chimice obişnuite de tipul dializei sau gel-filtrării.

Rolul de inhibitori ireversibili poate fi jucat şi de ionii unor metale grele astfel că, studiile cinetice ale acestora se fac în prezența EDTA sau a altor agenți de chelatizare pentru îndepărtarea lor;

b) ***inhibitorii reversibili*** sau inhibitorii propriu-zişi diminuează viteza reacțiilor enzimatice, dar aceasta revine la valoarea ei normală după înlăturarea inhibitorului. Adăugarea în mediul de incubare a unui inhibitor reversibil are repercusiuni asupra valorilor constantelor cinetice K_M şi V_{max}. În funcție de modificarea acestor parametri, inhibiția reversibilă este de mai multe tipuri:

- ***inhibiția competitivă*** când inhibitorul determină o creştere a valorii constantei K_M (deci o diminuare a afinității dintre enzimă şi substrat), parametrul V_{mzx} rămânând constant;
- ***inhibiția necompetitivă*** când are loc o diminuare a valorii lui V_{mzx} (K_M rămâne constant);
- ***inhibiția incompetitivă*** sau ***anticompetitivă*** în care ambii parametri cinetici îşi micşorează valoarea într-un raport constant;
- ***inhibiția mixtă*** care este o combinare a două sau a tuturor celor trei efecte anterioare.Schema generală a unei reacții enzimatice în prezența inhibitorilor reversibili poate fi redată astfel (*Botts* şi *Morales*, 1953):

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY



Prin omiterea unor căi din această schemă se obține fiecare din cele patru tipuri de inhibiție reversibilă.

a) Inhibiția competitivă

Atunci când în mediul de reacție există substanțe înrudite structural cu substratul natural al enzimei respective, acestea se pot lega la centrul activ al enzimei. În acest caz, inhibitorul şi substratul se află în competiție pentru situsul catalitic enzimatic. Dacă mediul de reacție conține concentrații crescute de substrat inhibiția dispare (competiția este „câştigată" de substrat a cărui concentrație este net superioară celei a inhibitorului). Deoarece atât substratul cât şi inhibitorul interacționează cu centrul activ al enzimei, în inhibiția competitivă au loc următoarele reacții:

$$E + S \underset{k_{-1}}{\overset{k_{+1}}{\rightleftharpoons}} ES \underset{k_{-2}}{\overset{k_{+2}}{\rightleftharpoons}} E + P$$

$$E + I \underset{k_{-3}}{\overset{k_{+3}}{\rightleftharpoons}} EI$$

Complexul EI nu se scindează cu formarea vreunui produs de reacție, fiind un ***complex neproductiv***. Pentru ecuațiile de mai sus, relația de echilibru se poate scrie ca fiind:

$$k_{+1}[E]\cdot[S] = (k_{-1} + k_{+2})\cdot[E]$$

de unde:

$$\frac{[E]\cdot[S]}{[ES]} = \frac{k_{-1} + k_{+2}}{k_{+1}} = K_M$$

şi respectiv:

$$k_{+3}\,[E][I] = k_{-3}\,[E\,I]$$

de unde:

$$\frac{[E]\cdot[I]}{[EI]} = \frac{k_{-3}}{k_{+3}} = K_i$$

Constanta K_i se numeşte ***constantă de inhibiție*** şi descrie echilibrul dintre enzimă, inhibitor şi complexul EI.

Prelucrarea matematică a acestor relații (vezi IV.2.2) dă ecuația de viteză a reacției enzimatice în prezența unui inhibitor competitiv:

$$v = \frac{V_{max}\cdot[S]}{[S] + K_M\left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)}$$

Comparând această relație cu ecuația Michaelis-Menten (IV.2.2) se observă că valoarea constantei K_M este multiplicată cu termenul $1+([I]/K_i)$. Acest produs reprezintă constanta Michaelis în prezența inhibitorului competitiv:

$$K'_M = K_M\left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)$$

deci inhibiția competitivă determină creşterea valorii constantei Michaelis (fig. 101).

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

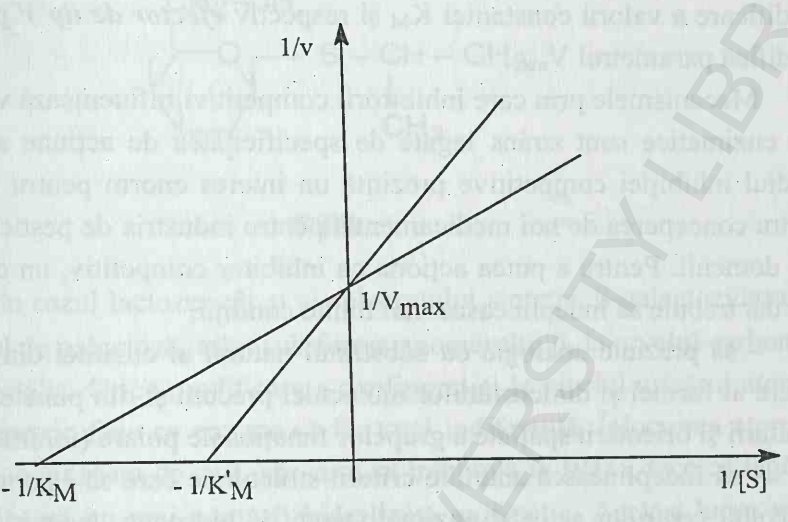


Fig. 101. Reprezentarea grafică a funcției Lineweaver-Burk pentru o enzimă inhibată competitiv

Există multe exemple de inhibiție pur competitivă. Astfel succinat-dehidrogenaza, al cărei substrat natural este acidul succinic, prezintă față de acesta o valoare a constantei Michaelis $K_M=1,3x10^{-3}M$. Dacă în mediul de reacție se adaugă acid malonic, acesta este un inhibitor competitiv ce determină creșterea valorii constantei Michaelis în funcție de concentrația sa, constanta de inhibiție fiind $K_i=4,1x10^{-5}M$. În mod similar L-alanin-dehidrogenaza ($K_M=1,7x10^{-3}M$ în raport cu L-alanina) este inhibată competitiv de către D-alanină ($K_i=2x10^{-2}M$).

Există numeroși compuși ce manifestă inhibiție competitivă pentru multe enzime datorită similitudinii structurale cu substratele naturale ale acestora. Sunt însă și situații când multe substanțe pot juca rol de inhibitori competitivi, fără a fi omologi structurali ai substratelor. În aceste situații este posibil ca centrul activ al enzimelor, datorită caracterului hidrofob și flexibilității sale, să poată lega diferite molecule, chiar dacă acestea sunt diferite structural de substratele naturale, complecșii rezultați fiind neproductivi. În cazul enzimelor oligomere, acești compuși se pot fixa la nivelul diferitelor situsuri, altele decât centrul activ, determinând o deformare a moleculelor enzimatice. În toate aceste cazuri are loc o inhibiție de tip competitiv deoarece are loc o modificare a valorii lui K_M. Pentru a evita confuziile, *Monod*

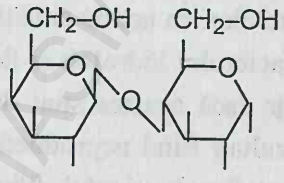
atribuie denumirea de ***efector de tip K*** pentru toți inhibitorii ce determină o modificare a valorii constantei K_M și respectiv ***efector de tip V*** pentru cei ce modifică parametrul V_{max}.

Mecanismele prin care inhibitorii competitivi influențează viteza reacțiilor enzimatice sunt strâns legate de specificitatea de acțiune a enzimelor. Studiul inhibiției competitive prezintă un interes enorm pentru toxicologie, pentru conceperea de noi medicamente, pentru industria de pesticide și multe alte domenii. Pentru a putea acționa ca inhibitor competitiv, un compus chimic dat trebuie să îndeplinească mai multe condiții:

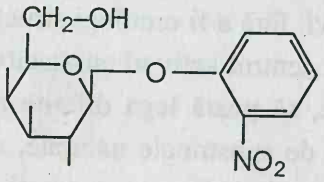
– să prezinte analogie cu substratul natural al enzimei din punctul de vedere al formei și dimensiunilor moleculei precum și din punctul de vedere al naturii și orientării spațiale a grupelor funcționale polare (ionizabile);

– să îndeplinească anumite criterii structurale care să-i permită legarea la nivelul centrului activ al enzimei (punți de hidrogen, legături ionice, interacțiuni hidrofobe etc.).

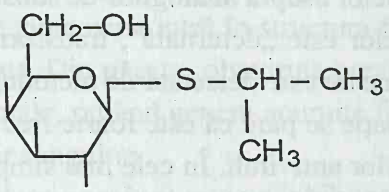
Primele studii privind inhibiția competitivă au fost efectuate asupra ***β-galactozidazei*** din *E. coli*. Molecula sa este un tetramer în care cele patru subunități sunt identice și au masele moleculare de 520 kDa. Această enzimă catalizează reacția de hidroliză a derivaților β-D-galactozidici cum ar fi lactoza. Pentru determinarea activității sale se folosește în mod curent substratul sintetic o-nitrofenil-β-D-galactopiranoza (ONPG), iar inhibitorul specific este izopropil-tio-β-D-galactopiranoza (IPTG). Ambii compuși au o structură chimică apropiată de cea a lactozei numai că unul din ei (ONPG) este hidrolizat de enzimă, putând deci juca rol de substrat (cu K_M = 0,95 mM la pH = 7,6 și 20° C), în timp ce celălalt (IPTG) nu poate fi hidrolizat și joacă rol de inhibitor competitiv:



lactoză



ONPG



IPTG

Atât în cazul lactozei cât şi al substratului sintetic, β-galactozidaza clivează restul de galactoză, aflat sub forma anomerului β, la nivelul carbonului său semiacetalic. Orice modificare a configuraţiei la nivelul oricărui atom de carbon asimetric face ca enzima să fie total indiferentă. Înlocuirea atomului de oxigen cu un atom de sulf, aşa cum se întâmplă în IPTG, face ca legătura β-glicozidică să nu mai poată fi hidrolizată enzimatic. Acelaşi lucru se întâmplă şi în cazul înlocuirii grupării alcoolice primare (de la C_6 al restului de galactoză) cu o grupare metil.

Dacă condiţiile structurale sunt deosebit de riguroase în ceea ce priveşte restul de galactoză, enzima este mult mai puţin specifică în raport cu restul de glucoză, ceea ce face ca în metodele de determinare a activităţii β-galactozidazei să se folosească în calitate de substrat nu numai lactoza ci şi o serie întreagă de derivaţi O-glicozidici ai β-D-galactozei.

În prezent se cunosc foarte mulţi compuşi capabili să exercite inhibiţie competitivă asupra diferitelor sisteme enzimatice şi mulţi inhibitori de acest tip prezintă importante utilizări practice. De cele mai multe ori inhibitorii competitivi prezintă similitudini structurale cu substratele naturale ale enzimelor pe care le inhibă. Printre aceştia se numără şi numeroase pesticide, erbicide şi agenţi antivirali al căror mecanism de acţiune constă în stoparea biosintezei acidului nucleic al agentului patogen.

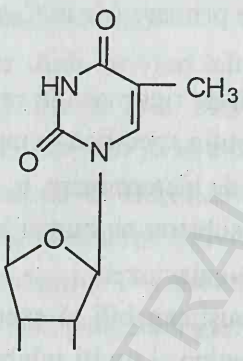
Un inhibitor competitiv propriu-zis nu este transformat de către enzima asupra căreia acţionează. Dacă un anumit compus ce prezintă o structură chimică asemănătoare cu cea a substratului natural este transformat de către enzima respectivă, el nu poate fi catalogat ca fiind inhibitor competitiv ci este un ***analog de substrat***. Uneori, acţiunea enzimelor asupra analogilor de substrat aminteşte de cinetica reacţiilor enzimatice inhibate competitiv, fapt ce ar putea avea următoarele explicaţii:

– acțiunea enzimelor asupra analogilor de substrat este foarte lentă;

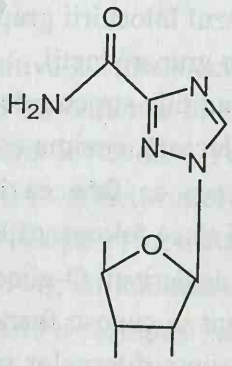
– acțiunea enzimelor este „deturnată", transformările ce au loc decurgând într-o altă direcție ce nu este detectată de metodele respective.

Cea de a doua situație se pare că este foarte frecventă, întâlnindu-se, de exemplu, în cazul agenților antivirali. În cele mai simple cazuri, agentul antiviral concură cu substratul natural al unei enzime implicată într-o reacție importantă, absolut necesară replicării virusului. În alte cazuri, agentul antiviral este transformat, substituind substratul natural și conduce la apariția unui compus care este inhibitorul competitiv al enzimei implicată în etapa următoare a ciclului viral (*Mazunder, A. et al.* – 1994).

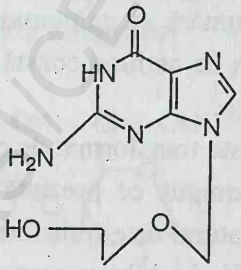
Printre cei mai cunoscuți agenți antivirali se numără trei compuși ce au o structură chimică similară cu cea a timidinei: ribavirina, acicloguanozina (aciclovir) și respectiv azatimidina (AZT):



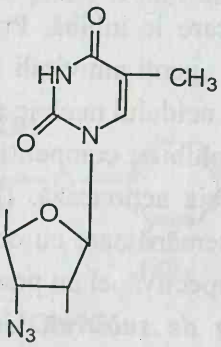
timidină



ribavirină



aciclovir
(acicloguanozină)



AZT
(azatimidină)

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Ribavirina este un analog structural al guanozinei foarte activ față de unele virusuri deoarece guanozina intră în structura fragmentului 5'-terminal al ARN_m prezent în virus. Din păcate, ribavirina prezintă o anumită toxicitate și asupra celulelor normale, putând genera anumite forme de anemie în urma acțiunii asupra celulelor sanguine.

Aciclovirul (***acicloguanozina***) este un inhibitor competitiv care, sub acțiunea timidin-kinazei specifice din virusul herpesului, este transformat în derivatul său monofosforilat ce intră, la rândul său, în competiție cu acidul deoxitimidilic (dTMP). Acesta din urmă este fosforilat în mod normal de kinazele celulare specifice cu formare de dTDP și dTTP. De aceea, celulele infectate sunt primele în care ADN-polimeraza se inactivează datorită absenței dTTP-ului.

Azatimidina (AZT, numită și ***Zidovudină*** sau ***Retrovir***) este un medicament utilizat în tratarea SIDA chiar dacă are și unele efecte toxice asupra măduvei osoase. Ea este transformată în derivatul său trifosforilat (AZTTP) de către kinazele celulare, acesta din urmă jucând rol de inhibitor competitiv al revers-transcriptazei. De fapt, AZT manifestă două acțiuni asupra revers-transcriptazei: pe de o parte concură cu substratul natural (dTTP) pentru centrul activ al enzimei, iar pe de altă parte întrerupe etapa de elongare a ADN-ului deoarece gruparea azidică (N_3) împiedică legarea nucleotidului următor. S-a demonstrat că revers-transcriptaza este de peste 100 de ori mai sensibilă la acțiunea AZTTP decât ADN-polimeraza celulară. De asemenea, AZT este inhibitor competitiv și pentru ***integrază***, enzimă implicată în ciclul viral la nivelul integrării ADN-ului viral rezultat în urma transcripției inverse (*Mazunder, A. et al.* – 1994).

b) Inhibiția necompetitivă

Acest tip de inhibiție are loc atunci când între inhibitor și substrat nu există nici o analogie structurală, inhibitorul legându-se la situsuri specifice, altele decât situsul catalitic. În asemenea situații, nu există nici o concurență între substrat și inhibitor. Legarea inhibitorului de enzimă determină diferite modificări conformaționale ale moleculelor enzimatice cu repercusiuni asupra valorilor parametrilor cinetici. ***Inhibiția necompetitivă pură*** caracterizată prin modificarea lui V_{max}, fără ca valoarea constantei K_M să fie afectată, apare în foarte puține cazuri. Cei mai cunoscuți inhibitori necompetitivi sunt com-

puşii cu molecule mici de tipul protonilor, ionilor metalici etc. Deoarece inhibitorul reacţionează cu enzima la nivelul unor situsuri diferite de cel catalitic, în inhibiţia necompetitivă se pot forma două tipuri de complecşi binari (ES şi EI) şi un complex ternar (ESI) în care enzima fixează atât substratul cât şi inhibitorul:

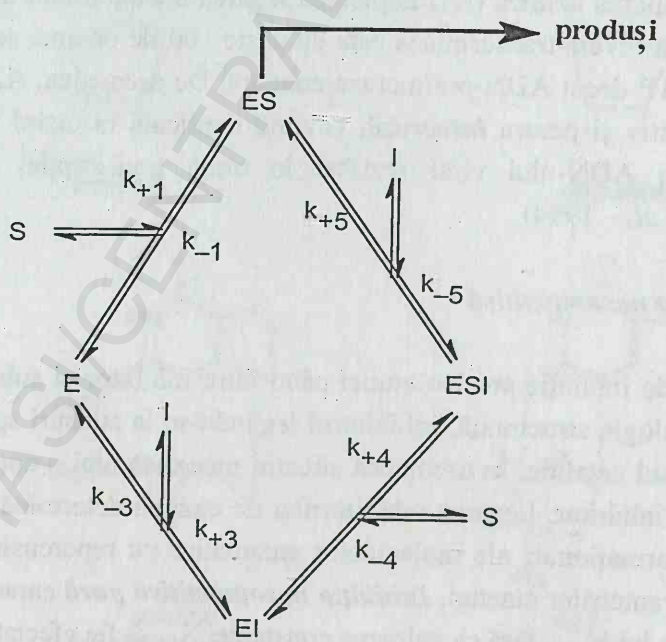
$$E + S \underset{k_{-1}}{\overset{k_{+1}}{\rightleftharpoons}} ES \underset{k_{-2}}{\overset{k_{+2}}{\rightleftharpoons}} E + P$$

$$E + I \underset{k_{-3}}{\overset{k_{+3}}{\rightleftharpoons}} EI$$

$$EI + S \underset{k_{-4}}{\overset{k_{+4}}{\rightleftharpoons}} ESI$$

$$ES + I \underset{k_{-5}}{\overset{k_{+5}}{\rightleftharpoons}} ESI$$

Există deci două căi de formare a complexului ternar ESI:



BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Prin calcule similare celor anterioare, se scriu relațiile de echilibru pentru fiecare ecuație, iar prin prelucrare matematică se determină ecuația ce descrie viteza de reacție în prezența unui inhibitor necompetitiv ca fiind:

$$v = \frac{V_{max} \cdot [S]}{K_M + [S]} \cdot \frac{1}{1 + \frac{[I]}{K_i}}$$

sau:

$$v = \frac{V'_{max} \cdot [S]}{K_M + [S]}$$

în care:

$$V'_{max} = \frac{V_{max}}{1 + \frac{[I]}{K_i}}$$

Deci, în inhibiția necompetitivă, are loc o scădere a valorii parametrului V_{max}, constanta K_M rămânând nemodificată (fig. 102).

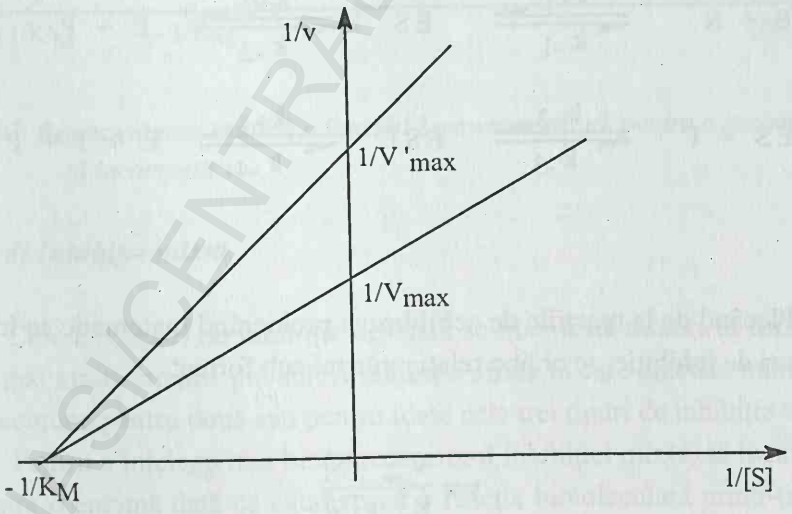


Fig. 102. Reprezentarea grafică a ecuației Lineweaver-Burk pentru o enzimă inhibată necompetitiv

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Deoarece inhibitorul nu concură cu substratul pentru centrul activ al enzimei, K_M rămâne nemodificat, ceea ce înseamnă că afinitatea enzimei pentru substratul său nu se schimbă.

Inhibiția necompetitivă pură apare în foarte puține cazuri deoarece interacțiunea inhibitorului cu enzima determină, de regulă, o deformare a moleculei enzimatice, ceea ce înseamnă că și conformația centrului activ poate să sufere modificări mai mult sau mai puțin pronunțate. Acestea la rândul lor determină și o modificare a afinității enzimei pentru substrat și deci a constantei K_M. Pentru a putea fi delimitată de inhibiția competitivă, acest tip de inhibiție se mai numește și ***inhibiție competitivă aparentă***, iar reprezentarea grafică a ecuației Lineweaver-Burk nu este o dreaptă ci are aspect hiperbolic.

c) Inhibiția incompetitivă (anticompetitivă)

Complexul ternar ESI ce se formează în inhibiția necompetitivă ia naștere prin interacțiunea enzimei libere cu inhibitorul, complexul EI format astfel interacționând apoi cu substratul. În inhibiția incompetitivă, inhibitorul nu se fixează pe enzima liberă ci interacționează cu complexul Michaelis, din care cauză are efecte similare atât asupra lui V_{max} cât și a lui K_M. În acest caz au loc reacțiile:

$$E + S \underset{k_{-1}}{\overset{k_{+1}}{\rightleftharpoons}} ES \underset{k_{-2}}{\overset{k_{+2}}{\rightleftharpoons}} E + P$$

$$ES + I \underset{k_{-3}}{\overset{k_{+3}}{\rightleftharpoons}} ESI \underset{k_{-4}}{\overset{k_{+4}}{\rightleftharpoons}} E + I + P$$

Plecând de la reacțiile de echilibru și prelucrând matematic ca în celelalte tipuri de inhibiție, se obține relația vitezei sub forma:

$$v = \frac{V'_{max} \cdot [S]}{K'_M + [S]}$$

în care:

$$V'_{max} = \frac{V_{max}}{1+\frac{[I]}{K_i}} \quad ; \quad K'_M = K_M\left(1+\frac{[I]}{K_i}\right)$$

Factorul $1+([I]/K_i)$ modifică atât V_{max} şi K_M, ceea ce înseamnă că inhibitorii incompetitivi afectează ambii parametri cinetici dar nu modifică raportul V_{max}/K_M (fig. 103).

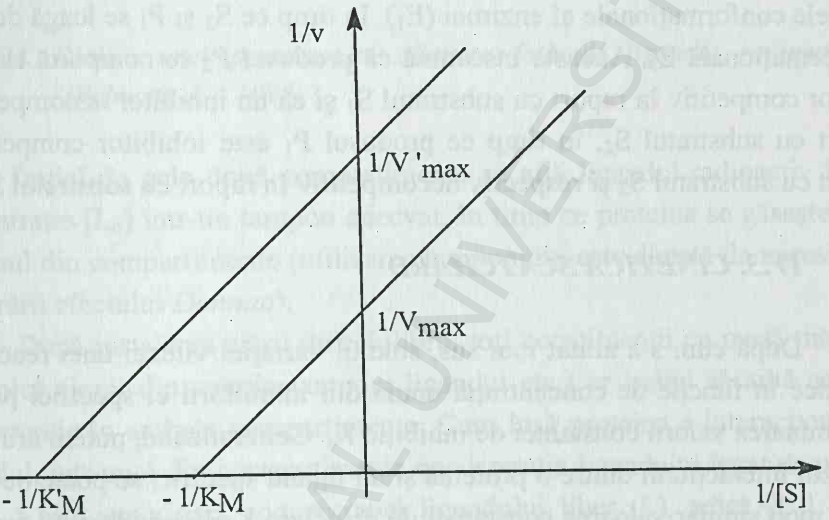


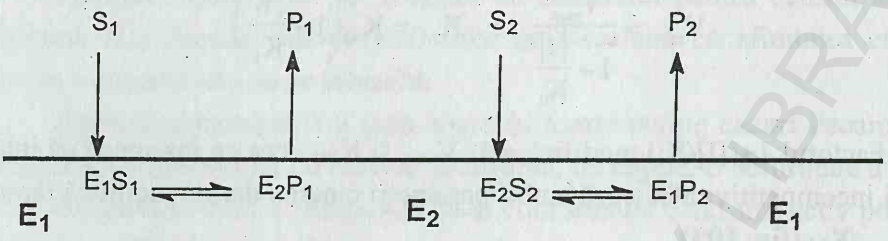
Fig. 103. Reprezentarea grafică a funcţiei Lineweaver-Burk pentru o enzimă inhibată incompetitiv

d) Inhibiţia mixtă

Cele trei tipuri de inhibiţie descrise se manifestă rareori în formă pură. Cele mai multe enzime pot suferi inhibiţie mixtă în care efectele inhibitorului sunt comune pentru două sau pentru toate cele trei tipuri de inhibiţie simplă.

Pentru a înţelege mai bine mecanismul inhibiţiei mixte, să luăm în considerare o enzimă dată ce catalizează o reacţie bimoleculară printr-un mecanism de tip *ping-pong* (vezi cap. IV.2.2.). Enzima poate oscila între două forme conformaţionale $E_1 \leftrightarrow E_2$ şi acţionează asupra substratelor S_1 şi S_2 pentru a forma produşii P_1 şi P_2:

BCU "LUCIAN BLAGA" CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY



Se constată că substratul S_1 şi produsul P_2 se leagă numai de una din formele conformaționale al enzimei (E_1), în timp ce S_2 şi P_1 se leagă de forma conformațională E_2. Aceasta înseamnă că produsul P_2 se comportă ca un inhibitor competitiv în raport cu substratul S_1 şi ca un inhibitor necompetitiv în raport cu substratul S_2, în timp ce produsul P_1 este inhibitor competitiv în raport cu substratul S_2 şi respectiv necompetitiv în raport cu substratul S_1.

IV.3. CINETICA SCATCHARD

După cum s-a arătat mai sus, studiul variației vitezei unei reacții enzimatice în funcție de concentrația unuia din inhibitorii ei specifici permite determinarea valorii constantei de inhibiție K_i. Generalizând, putem afirma că în cazul interacțiunii dintre o proteină şi un ligand specific, se poate determina în mod similar valoarea constantei de disociere K_i a complexului proteină – ligand. În acest scop, cel mai adesea se utilizează metoda dializei care, deşi nu poate fi aplicată în cazul inhibitorilor competitivi, se utilizează cu succes în cazul tuturor proteinelor capabile să interacționeze în mod specific cu un ligand la nivelul unui sau mai multor situsuri, deci şi în cazul inhibiției necompetitive şi respectiv incompetitive.

Să presupunem că o proteină dată recunoaşte un ligand **L** marcat radioactiv a cărui concentrație poate fi evaluată în orice moment, cunoscându-i-se radioactivitatea sa specifică (numărul de dezintegrări / minut • mol). Pentru simplificarea raționamentului să considerăm că ligandul L nu este transformat de către proteină. Înlăturarea excesului de ligand se face prin dializă, folosind o membrană semipermeabilă corespunzătoare (fig. 104).

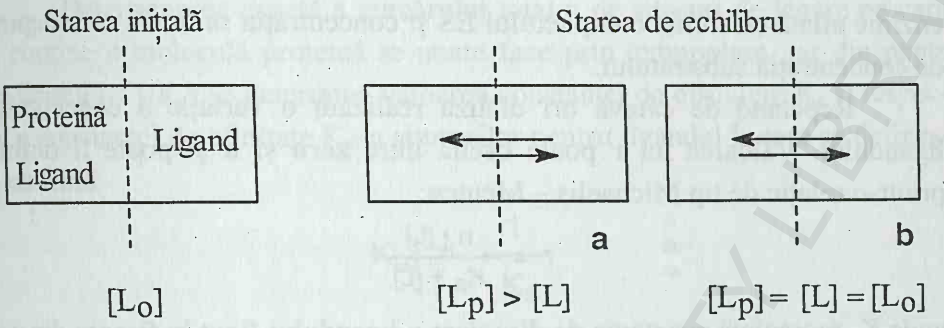


Fig. 104. Dializa unei proteine cu afinitate față de ligandul radioactiv L (Pelmont, J. – 1995)

Inițial, în cele două compartimente se află ligandul radioactiv într-o concentrație $[L_o]$ într-un tampon adecvat, în timp ce proteina se găsește doar într-unul din compartimente (utilizarea tamponului este dictată de necesitatea înlăturării efectului *Donnan*).

După instalarea stării de echilibru, toți constituenții cu masă moleculară mică (ionii din soluția tampon, ligandul etc.) ar trebui să aibă aceeași concentrație în ambele compartimente. Cum însă proteina a interacționat cu ligandul, într-unul din compartimente concentrația ligandului legat de proteină (L_p) este superioară concentrației ligandului liber (L), adică $[L_p] > [L]$ (figura 103 a). În cazul în care proteina în cauză nu prezintă nici o afinitate față de ligandul L, concentrația acestuia rămâne aceeași în ambele compartimente, adică $[L_p] = [L] = [L_o]$ (figura 103 b). Dacă admitem că starea de echilibru nu este influențată de nici un alt factor, concentrația ligandului liber [L] va fi aceeași în ambele compartimente.

Atunci când concentrația inițială a ligandului este relativ crescută comparativ cu cea a proteinei, la echilibru concentrația ligandului în cele două compartimente [L] este practic egală cu concentrația inițială $[L_o]$ cu excepția situației în care proteina leagă o cantitate mare de ligand.

Să presupunem că molecula proteică conține **n** situsuri de legare a ligandului L care funcționează independent și că, dintre acestea, doar **r** situsuri leagă moleculele ligandului. În acest caz, raportul dintre numărul de situsuri „ocupate" și numărul lor total depinde de concentrația ligandului L, situație absolut identică cu cea întâlnită la raportul dintre concentrația unei

enzime aflată cu forma complexului ES şi concentraţia sa totală care depinde de concentraţia substratului.

Repetând de câteva ori dializa realizăm o variaţie a concentraţiei ligandului. Valoarea lui **r** poate oscila între **zero** şi **n** şi poate fi definită printr-o relaţie de tip Michaelis – Menten:

$$r = \frac{n \cdot [L]}{K_S + [L]}$$

unde K_s reprezintă constanta de disociere a ligandului fixat în fiecare din cele r situsuri ale moleculei proteice. Rearanjând termenii, relaţia de mai sus poate fi scrisă şi sub forma:

$$\frac{r}{[L]} = \frac{n}{K_S} - \frac{r}{K_S}$$

Reprezentarea grafică a acestei ecuaţii, trecând valorile lui r pe abscisă şi r / [L] pe axa ordonatelor, poartă numele de ***graficul Scatchard*** (fig. 104), existând o foarte mare similitudine între această reprezentare şi graficul Eadie pentru enzime.

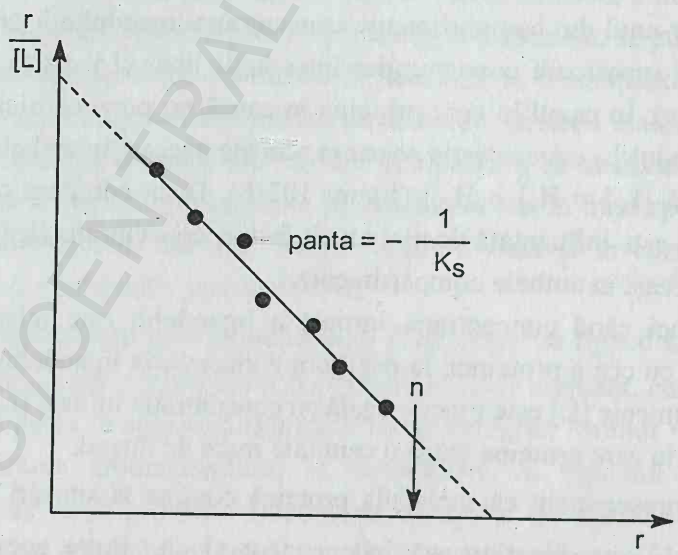


Fig. 105. Graficul Scatchard în cazul interacţiunii unei proteine cu un ligand specific

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Determinarea exactă a numărului total n de situsuri de legare pe care le conține o moleculă proteică se poate face prin extrapolare, iar din panta graficului ($-1/K_s$) se determină valoarea constantei de disociere K_s și respectiv a constantei de afinitate K_{af} a situsurilor pentru ligandul L care se definește ca fiind:

$$K_{af} = \frac{1}{K_s}$$

Această reprezentare mai poate fi interpretată și ca fiind o reprezentare a variației raportului ligand legat/ligand liber în funcție de concentrația ligandului legat. Această metodă permite deci evaluarea numărului de situsuri n care poate fi mai mare de 1 la proteinele oligomere (ce prezintă structură cuaternară).

Studiul interacțiunii proteină – ligand prin metoda Scatchard presupune obligativitatea instalării unui echilibru între complexul proteină – ligand și speciile moleculare care formează acest complex, această situație nefiind însă întâlnită într-o serie de cazuri particulare ca de exemplu în cazul ***celulazelor***. Substratul acestor enzime (**celuloza**) este insolubil și prezintă o structură heterogenă.

Atacul celulazelor asupra substratului nu se poate realiza decât în urma adsorbției enzimelor celulozolitice pe acest compus macromolecular. Adsorbția celulazelor conduce însă la o serie de modificări ireversibile în molecula substratului determinate de separarea fibrelor de celuloză din rețeaua cristalină.

Adsorbția celulazelor se face la nivelul unui domeniu structural special din molecula enzimei (**domeniul de legare**) situat la capătul N– sau C–terminal și care se leagă de **domeniul catalitic** printr-un fragment flexibil (fig. 106).

Celulazele diferă între ele prin localizarea spațială diferită a domeniilor catalitic, respectiv de legare (*Beguin, P. et al.* – 1992).

BCU IASI CENTRU UNIVERSITARY LIBRARY

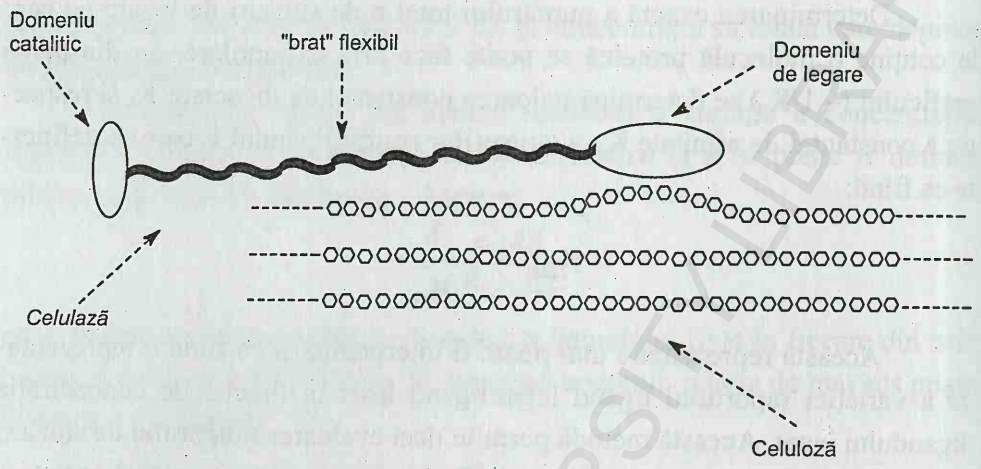


Fig. 106. Reprezentarea schematică a mecanismului de interacţiune dintre enzimele celulozolitice şi substratul acestora (Beguin, P. et al. – 1992).

BCU IAŞI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

V. METODE ŞI TEHNICI UTILIZATE ÎN ENZIMOLOGIE

Datorită structurii lor chimice şi rolului pe care-l îndeplinesc în organismele vii, enzimele prezintă unele caracteristici comune cu ale altor biomolecule dar şi proprietăţi specifice. Fiind proteine, enzimele prezintă toate proprietăţile fizico-chimice şi structurale ale acestora. Fiind biocatalizatori, respectă toate legile catalizei chimice, iar faptul că acţionează în organismele vii determină o serie de caracteristici specifice (vezi cap.IV.1).

Un studiu complet şi corect al enzimelor sub aspectul structurii lor chimice, cineticii reacţiilor enzimatice, specificităţii lor de acţiune etc. presupune, în primul rând, izolarea lor din surse biologice şi purificarea până la un grad de puritate cât mai înalt. Metodele utilizate la izolarea şi purificarea enzimelor sunt comune cu cele utilizate în studiul proteinelor în general. Spre deosebire însă de proteinele necatalitice, în cazul enzimelor trebuie evitată nu numai denaturarea ci şi inactivarea lor.

Este cunoscut faptul că stabilitatea maximă a enzimelor se întâlneşte *in vivo*, adică în mediul lor natural. Cu cât gradul lor de puritate creşte, cu atât stabilitatea enzimelor scade, fapt ce impune unele precauţiuni suplimentare pe parcursul procedurilor de separare şi purificare. Principalii factori ce inactivează enzimele în timpul acestor proceduri sunt temperatura şi pH-ul mediului. În afara temperaturilor ridicate şi a valorilor extreme de pH, enzimele sunt puternic afectate şi de modificările bruşte ale acestor factori. De aceea, toate operaţiunile se execută la rece (0÷ +4°C), iar separarea fazei insolubile se face utilizând centrifuga cu răcire. Sunt şi operaţiuni care se execută la temperaturi foarte joase. De exemplu, precipitarea enzimelor cu diferiţi solvenţi (acetonă, alcool izopropilic etc.) se face la –15°C sau chiar –20°C.

Modificarea pH-ului într-un interval mic al valorilor acestui parametru determină o modificare mai mult sau mai puţin accentuată a activităţii enzimelor, iar valorile extreme (de regulă în afara intervalului de pH 5–9) produc chiar denaturarea acestora. De aceea, ajustarea pH-ului se face la pH-metru şi nu cu ajutorul hârtiei indicatoare. Acest lucru se face sub agitare continuă, utilizând soluţii acide sau alcaline diluate care se adaugă cu picătura pentru a

evita o modificare prea puternică a pH-ului în zona de contact din jurul picăturii.

Şi modificarea tăriei ionice a mediului are influenţă asupra capacităţii catalitice a enzimelor prin afectarea structurii chimice a biocatalizatorului. Acest lucru se explică prin faptul că enzimele au, în general, o structură compactă în care resturile polare sunt orientate spre exterior în marea lor majoritate interacţionând cu dipolii apei.

Forţa ionică a mediului poate perturba stratul apos din imediata vecinătate a moleculei enzimatice. În mod similar pot acţiona şi unii agenţi tensioactivi utilizaţi în scopul solubilizării enzimelor fixate în membranele biologice ale diferitelor structuri subcelulare. Şi prezenţa în mediu, chiar în concentraţii mici, a inhibitorilor şi activatorilor influenţează capacitatea catalitică a enzimelor. Un factor extern ce poate influenţa puternic activitatea enzimelor îl reprezintă contaminarea microbiană, motiv pentru care operaţiunile de separare şi purificare trebuie efectuate cât mai repede posibil.

În cercetările de enzimologie se utilizează soluţii preparate în apă distilată sau bidistilată (în funcţie de enzimă), iar reactivii folosiţi trebuie să aibă un grad de purificare cât mai înalt posibil. De regulă se folosesc reactivi din categoria ***chimic pur*** (*c.p.*) şi ***reactiv pentru analiză*** (*p.a.*).

V.1 SURSE DE ENZIME

Din punctul de vedere al localizării lor, enzimele se clasifică în două grupe principale:

a) ***enzime solubilizate*** în diferite lichide biologice (sânge, urină, lichid cerebrospinal, lichid interstiţial, spermă, salivă, citoplasmă, mediu de cultură pentru microorganisme, sevă etc.);

b) ***enzime fixate*** pe diferite structuri tisulare şi subcelulare. În acest din urmă caz, multe enzime sunt puternic legate de diferite componente ale membranelor biologice, făcând parte din structura lor. Alegerea sursei optime pentru izolarea şi purificarea unei enzime date se face în funcţie de mai multe criterii. În primul rând se alege materialul biologic cel mai bogat în enzima respectivă. Cum într-un ţesut localizarea unor enzime este diferită, iar în fiecare celulă enzimele sunt localizate preponderent sau exclusiv în anumite organite celulare, prima operaţiune a tehnicilor de izolare o constituie omogenizarea ţesutului şi separarea formaţiunilor subcelulare respective prin cen-

trifugare diferențiată. Deşi majoritatea enzimelor se întâlnesc în mai multe organite subcelulare, țesuturi, organe şi respectiv lichide biologice, există enzime localizate exclusiv într-o formațiune subcelulară fiind ***enzime indicator (marker)*** pentru fracțiunea subcelulară respectivă. Principalele enzime indicator sunt următoarele:

a) ***nuclee***:
- ARN-polimeraza ADN-dependentă;
- ATP : NMN-adenoziltransferaza.

b) ***mitocondrii***:
- monoamin-oxidaza;
- adenilat-kinaza;
- componentele catenei respiratorii.

c) ***peroxisomi***:
- catalazele;
- D-aminoacid-oxidazele;
- peroxidazele.

d) ***lisosomi***:
- fosfomonoesteraza acidă;
- catepsinele.

e) ***microsomi***:
- oxidaze NADPH-dependente;
- citocrom b_3-reductaza.

f) ***citosol***:
- aminoacil-ARN_t-sintetazele;
- acil-CoA-sintetazele;
- transcetolaza;
- fosfofructokinaza.

Localizarea enzimelor în organe, țesuturi şi celule este primul criteriu de care se ține cont în alegerea sursei optime. De exemplu, cea mai bună sursă de pepsină o reprezintă sucul gastric, în timp ce α-amilaza, tripsina şi lipaza se vor izola din țesutul pancreatic, iar fosforilaza din țesutul muscular.

Studiul metodelor de extracție şi purificare a enzimelor din cele mai diferite surse biologice ocupă un loc central în biotehnologia enzimatică. Pentru a argumenta acest lucru este suficient să menționăm faptul că producția mondială de enzime prezenta în 1990 o cifră de afaceri de cca. 600 milioane de dolari (*Scriban, R.* – 1993). Aproximativ 60% din cantitatea totală

de enzime se utilizează în industria agro-alimentară. Dintre acestea, 16 enzime sunt considerate *„enzime industriale"* şi ocupă aproximativ 90% din piaţa mondială de desfacere. Datorită importanţei lor practice, enzimele utilizate în industria agro-alimentară şi cea farmaceutică fac obiectul unor reglementări internaţionale foarte exigente în ceea ce priveşte producţia, precum şi puritatea lor chimică, biochimică şi microbiologică. Enzimele ce se utilizează în calitate de biocatalizatori în industria alimentară, farmaceutică, textilă, de pielărie etc. pot fi obţinute practic din toate sursele biologice, existând din acest punct de vedere trei categorii de enzime:

- enzime de origine vegetală;
- enzime de origine animală;
- enzime de origine microbiană.

a) Enzimele de origine vegetală

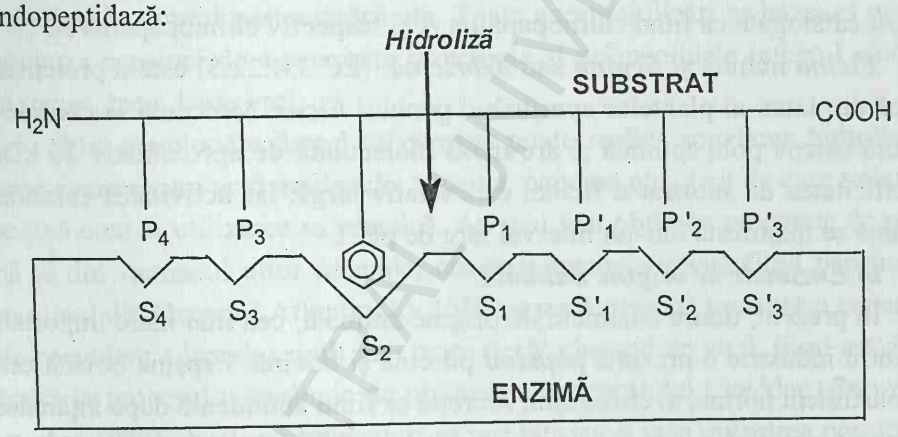
Din sursele vegetale se obţine o gamă largă de enzime, mai importante din punct de vedere practic fiind enzimele proteolitice: ***papaina*** sintetizată de o plantă din zonele tropicale (*Carica papaya*), ***bromelina*** sintetizată de ananas (*Ananas comosus* Merr), ***ficina*** din *Ficus glabrata* şi altele. Toate aceste enzime sunt proteinaze tiolice deoarece conţin în centrul lor activ o grupare tiolică liberă (un rest de cisteină) indispensabilă activităţii lor catalitice. Arborele de papaya este o plantă foarte răspândită în zonele tropicale, iar papaina brută sau purificată se obţine industrial în cantităţi foarte mari datorită numeroaselor sale aplicaţii practice în domeniul industrial şi terapeutic.

Cantităţile cele mai mari de papaină (aproximativ 12% din substanţa uscată) se găsesc în fructele de papaia, înainte de coacere. Pentru obţinerea industrială a papainei pure se recoltează latex-ul care se depozitează la rece (+4°C). Pentru înlăturarea impurităţilor se diluează cu apă distilată, se agită şi se centrifughează sau se filtrează pe kiesselguhr, după care se liofilizează sub vid la 50°C. Se obţine o pudră de culoare albă care însă se oxidează relativ uşor, devenind brună, datorită prezenţei grupelor –SH libere. Din această cauză, ambalarea se face în condiţii care împiedică atât oxidarea cât şi contaminarea microbiană.

Activitatea proteolitică a papainei industriale astfel obţinute oscilează între 40.000 şi 84.000 U.P. (unităţi proteazice). Prin electroforeză pe acetat de celuloză s-a demonstrat faptul că preparatele industriale de papaină conţin trei componente majore: ***papaina*** (EC 3.4.22.2), ***chimopapaina*** (EC 3.4.22.6) şi ***lizozimul*** sau ***muramidaza*** (EC 3.2.1.17).

Papaina înalt purificată a fost cristalizată prima dată în 1937 de către *Balls, T.* et al. Ea este o enzimă tiolică ce conține 211 resturi de aminoacizi și are o masă moleculară de 23 kDa. Temperatura optimă de acțiune se situează între 55 – 60°C, enzima având o termostabilitate crescută (denaturarea termică se observă abia la 65 – 70°C), iar pH-ul optim se înscrie în domeniul de pH 5,0 – 7,0 ceea ce facilitează utilizarea sa în diferite procese biotehnologice.

Fiind o proteinază tiolică, papaina este puternic inhibată de reactivii tiolici și, foarte interesant, este activată de către 2-mercaptoetanol. Este o enzimă foarte rezistentă la acțiunea denaturantă a solvenților organici. Specificitatea de acțiune a papainei este relativ largă, ea recunoscând nu mai puțin de șapte aminoacizi. Scindează însă preferențial legăturile peptidice realizate de resturile fenilalanină din interiorul catenelor polipeptidice, fiind o endopeptidază:



P_X – resturi de aminoacizi recunoscute de papainã de o parte și de cealaltã a restului de fenilalaninã
S_X – situsurile de legare pentru aminoacizii P_X corespunzãtori

Deși este o enzimă foarte stabilă, orice modificare, chiar și minoră în structura sa primară conduce la rezultate spectaculoase. Astfel, prin substituirea restului Cys_{25} cu un derivat izoaloxazinic cu acțiune inhibitoare (de exemplu 8-bromoacetil-10-metil-izoaloxazină), papaina își pierde complet activitatea peptidazică, în schimb capătă proprietatea de a oxida unii analogi ai NADH-ului de tipul N_1-alchil-14-dihidronicotinamidelor.

Papaina se utilizează în multe domenii industriale. Din cele aproximativ 300 de tone cât este consumul anual, aproximativ 75% reprezintă consu-

mul în industria berii, 10% în industria cărnii, 5% în fabricarea hidrolizatelor de peşte şi capete de pasăre pentru nutriţia animalelor, 2% în industria chimico-farmaceutică etc. Preparatele de papaină imobilizată se folosesc la hidroliza latex-ului de arahide, hidrolizatele obţinute utilizându-se la stabilizarea fizico-chimică a sucurilor de struguri şi mere.

Chimopapaina este o altă proteinază tiolică sintetizată de *Carrica papaya*. Ea se deosebeşte de papaină printr-o solubilitate mai mare şi printr-o mai bună stabilitate la valori acide de pH. În latex-ul arborelui de papaya, conţinutul în chimopapaină este cu mult mai mare decât cel de papaină, iar masa sa moleculară este cuprinsă între 27 – 33 kDa. În afară de proteine, chimopapaina mai hidrolizează şi alte substrate cum ar fi peptidele, poliamidele şi esterii aminoacizilor. Prin electroforeză pe acetat de celuloză, fracţiunea proteică reprezentată de chimopapaină se separă în două subfracţiuni care au fost catalogate ca fiind chimopapaina A şi respectiv chimopapaina B.

Ficina numită şi ***ficaină*** sau ***debricină,*** (EC 3.4.22.3) este o proteinază tiolică din latex-ul plantelor aparţinând genului *Ficus*. Molecula sa conţine o singură catenă polipeptidică şi are masa moleculară de aproximativ 26 kDa. Specificitatea de substrat a ficinei este relativ largă, iar activitatea catalitică maximă se manifestă într-un interval larg de pH.

b) Enzimele de origine animală

În prezent, dintre enzimele de origine animală, cea mai mare importanţă pentru industrie o prezintă ***pepsina*** porcină şi bovină. Pepsina bovină este un constituent normal al cheagului, secreţia sa fiind abundentă după înţărcare. Utilizarea practică a pepsinei porcine a început în perioada anilor '30 din secolul XX dar a cunoscut o amploare deosebită după 1960. Pentru obţinerea sa la scară industrială, se utilizează mucoasa gastrică de porc unde pepsina se găseşte sub forma precursorului său inactiv numit ***pepsinogen***. Pentru obţinerea pepsinei se pot utiliza mai multe metode, cea mai des folosită fiind extracţia, din mucoasa raclată, cu apă distilată acidulată cu acid clorhidric în prezenţă de cloroform. După filtrare se concentrează prin liofilizare, obţinându-se o pulbere albă, solubilă în apă (*Scriban, R. – 1993*).

Activarea pepsinogenului se realizează la pH < 6,0 şi constă într-o proteoliză limitată prin care se clivează mai multe peptide. Această conversie a pepsinogenului în pepsină activă se realizează practic prin menţinerea zimogenului timp de patru minute la pH = 2,0 – 2,5 sau timp de 12 ore la pH = 3,0 (*Scott, R.* – 1979). Pepsina obţinută este de fapt un amestec de trei enzime:

pepsina A (EC 3.4.23.1), ***pepsina B*** (EC 3.4.23.2) şi ***pepsina C*** (EC 3.4.23.3) activitatea catalitică este considerabilă în intervalul de pH 1,0 – 4,0 cu un pH optim de acţiune de 1,8 dar care poate însă oscila în funcţie de natura substratului. La temperaturi mai mari de 55°C pepsina aflată în soluţie apoasă este termolabilă, fapt ce îi limitează utilizarea în diferite procese biotehnologice, însă anumite tratamente de corecţie îi conservă capacitatea de coagulare a cazeinei, proprietate ce stă la baza fabricării brânzeturilor. Astfel, modificarea grupei –COOH libere din poziţia 11 (de exemplu prin esterificare) în molecula pepsinei porcine conduce la o modificare profundă a specificităţii de acţiune şi a proprietăţilor catalitice şi fizico-chimice. Sub această formă modificată pepsina îşi conservă însă capacitatea de a coagula proteinele putând fi folosită în industria laptelui (*Mo, C. Y. et al.* – 1980). Actualmente, pepsina se foloseşte în industria băuturilor răcoritoare, în industria berii la stabilizarea coloidală în timpul pasteurizării etc. Toate aceste utilizări se bazează pe proprietatea pepsinei de a precipita proteinele şi polipeptidele (efectul *clotting*) în sucuri, bere, lapte etc.

Mai menţionăm faptul că pepsina poate realiza scindarea hidrolitică a unor enzime cum ar fi amilazele, tripsina, papaina etc., fapt de care trebuie să se ţină cont la utilizarea sa practică. Au mai fost obţinute preparate de pepsină şi din stomacul altor animale, cea mai intens studiată fiind pepsina din morunul din Oceanul Atlantic. La 15°C această pepsină prezintă o capacitate de coagulare a laptelui mult mai mare decât cheagul de viţel, fiind astăzi utilizată în procesul tehnologic de obţinere a caşcavalului Cheddar (*Brewer, P. et al.* – 1984). Aceleaşi brânzeturi se pot fabrica şi prin utilizarea pepsinei de găină cu condiţia ca maturarea să nu depăşească trei luni. Aproximativ 50% din caşcavalul fabricat în Israel se obţine cu ajutorul pepsinei de găină, iar în Canada s-au obţinut rezultate foarte bune în fabricarea caşcavalului Cheddar prin utilizarea pepsinei de focă (*Shamsuzzaman, K. et al.* – 1985).

c) Enzimele de origine microbiană

Obţinerea enzimelor de origine microbiană a luat o amploare deosebită după clarificarea mecanismelor de biosinteză a enzimelor de către microorganisme. Spre deosebire de sursele de origine vegetală şi animală, folosirea surselor microbiene de enzime prezintă unele avantaje majore:

– producţia de enzime de natură microbiană nu depinde de condiţiile climaterice şi geografice;

– se utilizează materii prime regenerabile ce pot fi reprezentate deseori de deşeuri din alte industrii;

– randamentele pot fi mărite prin optimizarea condiţiilor de cultivare şi prin alegerea de tulpini microbiene performante.

Toate aceste avantaje au făcut ca producţia mondială de enzime de origine microbiană să cunoască o dezvoltare importantă în ultimele decenii, pentru obţinerea lor fiind necesară parcurgerea mai multor etape obligatorii.

○ **Stabilirea enzimei ce urmează a fi obţinută**

În obţinerea unei enzime de uz industrial se ţine cont, în primul rând, de procesele de biotransformare în care va fi utilizată enzima respectivă. Este absolut obligatorie determinarea principalelor caracteristici ale enzimei în cauză, cele mai importante fiind următoarele:

– **Specificitatea de acţiune**. Din acest punct de vedere o problemă extrem de importantă o constituie activitatea globală a preparatelor enzimatice comerciale dată fiind probabilitatea existenţei şi altor capacităţi catalitice pe lângă cea principală, activităţi ce pot realiza transformări indezirabile.

În cazul pectinazei de exemplu (enzimă utilizată pe scară largă în industria de cofetărie), preparatele enzimatice pot conţine de fapt trei enzime cu activităţi catalitice diferite. În funcţie de procesele ce urmează a se realiza, se aleg preparatele enzimatice convenabile a căror specificitate de acţiune se manifestă faţă de substratele de care dispunem.

– **pH-ul optim de acţiune**. Acest factor poate manifesta o influenţă hotărâtoare asupra bunei desfăşurări a proceselor biotehnologice realizate de enzime. În general, se aleg enzime ce îşi menţin activitatea catalitică într-un interval cât mai larg posibil de pH.

– **Temperatura optimă de acţiune**. În general, în industrie sunt preferate enzimele a căror temperatură optimă de acţiune este cât mai mare posibil deoarece la temperaturi relativ crescute este facilitată menţinerea sterilităţii mediului.

○ *Alegerea tulpinii microbiene*

Microorganismele capabile să sintetizeze în cantităţi crescute anumite enzime se întâlnesc, în condiţii naturale, în acele habitaturi care conţin substratele enzimelor respective, acesta fiind un factor extrem de important de care se ţine cont în alegerea tulpinii producătoare. De exemplu, dacă se intenţionează să se obţină enzime celulozolitice, tulpinile microbiene producătoare se vor izola din medii naturale bogate în celuloză. Iniţial cele mai

multe microorganisme se izolau din sol. Actualmente însă aria cercetărilor a fost mult extinsă, fiind studiată posibilitatea izolării producătorilor industriali de enzime şi din alte surse: ape reziduale, reziduuri din industria celulozei, a pielăriei, cea alimentară etc., reziduuri din zootehnie şi altele.

Pentru izolarea tulpinilor microbiene producătoare de enzime se folosesc metodele clasice, cea mai importantă fiind metoda cultivării pe medii îmbogăţite urmată de realizarea de subculturi pe medii selective. Într-un mediu selectiv ideal, substratul enzimei în cauză reprezintă unica sursă a unuia din elementele vitale (de exemplu unica sursă de carbon). Astfel, pentru obţinerea de amilaze, mediul selectiv trebuie să conţină amidonul ca unică sursă de carbon şi energie.

Pentru obţinerea de enzime la scară industrială, tulpinile microbiene producătoare trebuie să îndeplinească o serie de condiţii (*Aunstrup, K.* – 1979):

- să se dezvolte pe medii cât mai simple cu putinţă şi ieftine;
- să producă cât mai puţini metaboliţi secundari;
- enzima ce urmează a fi obţinută să fie exportată în mediul de incubare în aşa fel încât să fie uşor de izolat şi purificat;
- să nu fie poluante;
- să nu fie patogene şi să nu producă metaboliţi toxici.

Dacă enzimele în cauză urmează să fie utilizate în industria alimentară, tulpinile microbiene producătoare trebuie să îndeplinească toate condiţiile ***G.R.A.S.*** (*Generaly Recognized As Safe*) adică toate condiţiile impuse produselor alimentare. De aceea, orice nouă tulpină studiată, înainte de a fi utilizată în producerea de enzime, este supusă unui minuţios examen toxicologic, ceea ce necesită mult timp.

Acesta este motivul datorită căruia majoritatea cercetătorilor preferă tulpinile microbiene deja incluse în cataloagele GRAS (tabelul VIII). După alegerea tulpinii producătoare se pot face numeroase studii de optimizare a proceselor fermentative, iar ingineria genetică oferă posibilităţi teoretic infinite de ameliorare. Se apelează foarte des la realizarea de mutante în vederea obţinerii unor tulpini producătoare de enzime cu randamente superioare.

B.C.U. „M. EMINESCU" IAŞI
BIOLOGIE

Tabelul VIII.

*Microorganisme producătoare de enzime pentru industria alimentară (**

Enzime	Tulpini producătoare
Glucozo-izomeraza	*Actinoplanes missouriesses, Arthrobacter globiformis Streptomyces murinus, Streptomyces olivochromogenes, Streptomyces rubiginosus, Bacillus coagulans*
Amilaze	*Bacillus licheniformis, Bacillus megaterium, Bacillus stearothermophilus, Bacillus subtilis, Aspergillus niger, Aspergillus oryzae*
Pectinaze	*Aspergillus niger, Aspergillus oryzae, Penicillium funiculosum*
Dextranază	*Klebsiella planticola, Penicillium funiculosum*
Celulază	*Aspergillus niger, Aspergillus oryzae, Disporotrichum dimorphosporum, Humicola isolens, Penicillium emersonii, Penicillium funiculosum, Trichoderma harzianum, Trichoderma clongibrachiatum*
Glucanază	*Bacillus subtilis, Aspergillus niger, Aspergillus oryzae, Disporotrichum dimorphosporum, Penicillium emersonii, Trichoderma harzianum*
Inulinază	*Aspergillus niger, Kluyveromyces marxianus*
Invertază	*Aspergillus niger, Saccharomyces cerevisiae*
Lactază	*Aspergillus niger, Aspergillus oryzae, Kluyveromyces marxianus*
Lipază	*Aspergillus niger, Aspergillus oryzae, Mucor javanicus, Mucor pusillus, Rhizomucor miehi*
Proteaze	*Bacillus coagulans, Bacillus licheniformis, Bacillus subtilis, Aspergillus niger, Aspergillus melleus, Aspergillus oryzae, Endothia parasitica, Mucor pusillus, Rhizomucor miehi*
Cheag (labfer-ment)	*Kluyveromyces marxianus* (tulpină modificată)

*) *The association of microbial food enzyme producers (1992)*

În acelaşi timp, prin mutaţii pot fi suprimate acele caractere ale tulpinii sălbatice care influenţează negativ producţia industrială a enzimelor, dat fiind faptul că, deseori, tulpinile sălbatice produc unii metaboliţi secundari, alte enzime decât cea care ne interesează, antibiotice etc., compuşi ce se elimină relativ greu. De exemplu, în cazul obţinerii glucoamilazei, preparatele rezultate conţin de multe ori cantităţi relativ mari de transglucozidază, iar proteaza produsă de *Bacillus licheniformis* este impurificată cu bacitracină. Cea mai eficientă metodă constă în obţinerea unor mutante care să nu producă metaboliţii secundari respectivi (*Aunstrup, K.* – 1979).

În ultimul timp, ingineria genetică oferă noi posibilităţi de obţinere a enzimelor de interes industrial. Cel mai adesea se recurge la clonarea genei responsabile de biosinteza unei enzime dintr-un microorganism incompatibil cu industria alimentară într-un al microorganism agreat de G.R.A.S.

o ***Cultivarea tulpinii producătoare***

Iniţial, enzimele de origine microbiană se obţineau prin realizarea culturilor de suprafaţă pe medii solide sau semisolide. Această metodă se mai utilizează încă la obţinerea unor enzime de origine fungică cum ar fi amilazele (*Aspergillus sp.*), proteazele (*Aspergillus sp.* şi *Mucor sp.*), pectinazele (*Penicillium sp.*) şi altele. Actualmente sunt însă preferate culturile submerse deoarece în cazul culturilor pe mediu solid apar dificultăţi în ceea ce priveşte controlul temperaturii, umidităţii şi aerării. Culturile în mediu lichid reduc riscul contaminării şi permit controlul periodic al parametrilor biochimici şi microbiologici.

o ***Extracţia şi purificarea enzimelor***

La sfârşitul perioadei de cultivare, enzimele trebuie extrase din celule şi/sau lichidul de cultură după care sunt supuse unui şir de operaţiuni pentru obţinerea preparatelor comerciale. Cel mai adesea se foloseşte centrifugarea, filtrarea, evaporarea, precipitarea reversibilă, liofilizarea ş.a., iar preparatele enzimatice obţinute se pot comercializa sub formă de pudre, soluţii, cristale, sub formă imobilizată etc.

În cazul enzimelor intracelulare extracţia lor este mai dificilă şi presupune realizarea unei etape suplimentare de liză a celulelor microbiene, după care procedurile sunt similare cu cele aplicate enzimelor extracelulare.

V.2 EXTRACȚIA ENZIMELOR

În cazul enzimelor solubilizate în lichide biologice, extracția enzimelor se face direct din acestea. Pentru enzimele fixate pe structuri celulare, se efectuează mai întâi omogenizarea țesutului, izolarea structurilor subcelulare și solubilizarea enzimelor.

a) ***Omogenizarea țesuturilor*** animale și vegetale se face fie prin mojarare pe nisip de cuarț sau sticlă pisată, fie cu ajutorul omogenizatoarelor speciale (de exemplu de tip Potter). Pentru aceasta, se sacrifică animalul fără a-l stresa. Se recoltează imediat organul sau țesutul interesat și se introduce într-o capsulă rece, aflată pe gheață. Dacă omogenizarea și operațiunile ulterioare nu se execută imediat, se recomandă congelarea țesutului pentru a împiedica inactivarea enzimelor.

Se mărunțește apoi țesutul cu un bisturiu sau cu un foarfece rece. Fragmentele astfel obținute se introduc în tubul de omogenizare care este o eprubetă cu pereții interiori rodați. Aceasta se introduce apoi într-un pahar ce conține apă cu gheață, iar în tub se introduce pistilul omogenizatorului. Se apasă pe pedala acestuia pentru a conferi pistilului o mișcare de rotație și se omogenizează țesutul executând o mișcare de du-te–vino de-a lungul axului pistilului. Omogenizarea se realizează un anumit interval de timp și cu o anumită viteză de rotație, în funcție de tipul țesutului.

În lipsa omogenizatorului special, dezintegrarea țesutului se poate face și prin mojarare pe nisip de cuarț, sticlă pisată, oxid de aluminiu, pământ de diatomee etc. Se recomandă ca această operațiune să se execute la rece și în camere frigorifice speciale.

Atât omogenizarea cât și mojararea se face în prezența unui lichid de extracție (soluție salină izotonică, soluție izotonică de zaharoză, diferite soluții tampon, apă bidistilată etc.).

O altă modalitate de obținere a extractelor acelulare o constituie congelarea-decongelarea repetată, metodă des folosită în special pentru levuri. Dezintegrarea peretelui celular se mai poate efectua prin tratare cu ultrasunete, tratament enzimatic (lizozim, proteaze, lipază etc.), tratament chimic (deoxicolat de sodiu, triton X-100, uree, guanidină etc.) și alte metode.

b) ***Izolarea structurilor subcelulare.*** După omogenizarea țesutului, omogenatele obținute sunt supuse centrifugării diferențiate în vederea separării structurilor subcelulare.

Centrifugarea se face la rece, după ce instalația frigorifică a centrifugei cu răcire a fost cuplată în prealabil pentru răcirea rotorului şi eprubetelor. În funcție de scopul urmărit, se folosesc diferite viteze de rotație şi intervale de timp diferite. Figura 107 prezintă un exemplu de centrifugare diferențiată a omogenatelor hepatice, fără ca această schemă să fie universal valabilă.

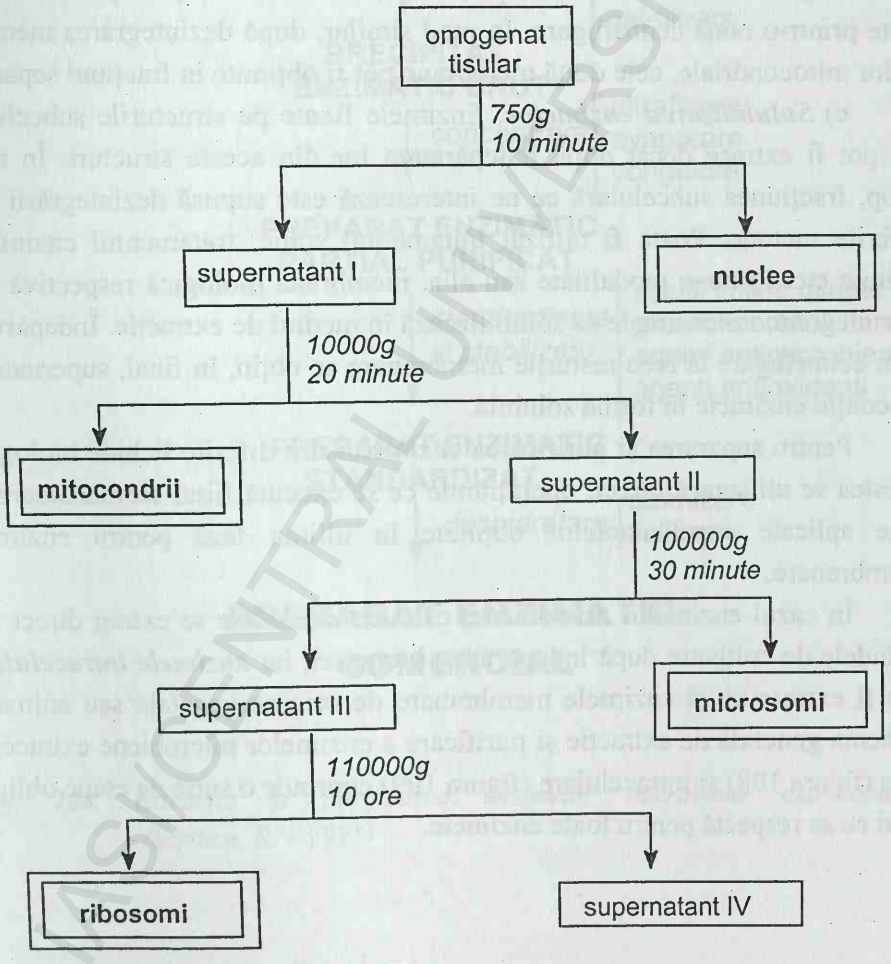


Fig. 107. Schema generală de centrifugare diferențiată a unui omogenat tisular

BCU "Ion Creangă" CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Deşi viteza de rotaţie este marcată la toate tipurile de centrifugă în rotaţii pe minut, în toate metodele şi tehnicile de centrifugare diferenţiată aceasta este redată ca multiplii ai acceleraţiei gravitaţionale (g) deoarece una şi aceeaşi centrifugă poate avea rotoare cu raze diferite, ceea ce înseamnă că forţa centrifugă este diferită pentru rotoare de diametru diferit la acelaşi număr de rotaţii pe minut.

Folosind viteze de rotaţie şi timpi intermediari pot fi obţinute fracţiuni mai fine. De exemplu, mitocondriile formează reziduuri în condiţii apropiate cu cele specifice reticulului endoplasmatic, cele două fracţiuni putând fi obţinute printr-o nouă centrifugare. În mod similar, după dezintegrarea membranelor mitocondriale, cele două membrane pot fi obţinute în fracţiuni separate.

c) ***Solubilizarea enzimelor***. Enzimele fixate pe structurile subcelulare nu pot fi extrase decât după îndepărtarea lor din aceste structuri. În acest scop, fracţiunea subcelulară ce ne interesează este supusă dezintegrării prin diferite metode. Poate fi utilizat tratamentul sonic, tratamentul enzimatic, chimic etc. Printr-o modalitate sau alta, membrana biologică respectivă este dezintegrată, iar enzimele se solubilizează în mediul de extracţie. Îndepărtând prin centrifugare la rece resturile membranare se obţin, în final, supernatante ce conţin enzimele în formă solubilă.

Pentru separarea şi purificarea enzimelor din diferite lichide biologice, acestea se utilizează direct, operaţiunile ce se execută fiind asemănătoare cu cele aplicate supernatantelor obţinute în ultima fază pentru enzimele membranare.

În cazul enzimelor microbiene, cele ***extracelulare*** se extrag direct din lichidele de cultivare după îndepărtarea biomasei, iar ***enzimele intracelulare*** pot fi extrase ca şi enzimele membranare de origine vegetală sau animală. Schema generală de extracţie şi purificare a enzimelor microbiene extracelulare (figura 108) şi intracelulare (figura 109) cuprinde o serie de etape obligatorii ce se respectă pentru toate enzimele.

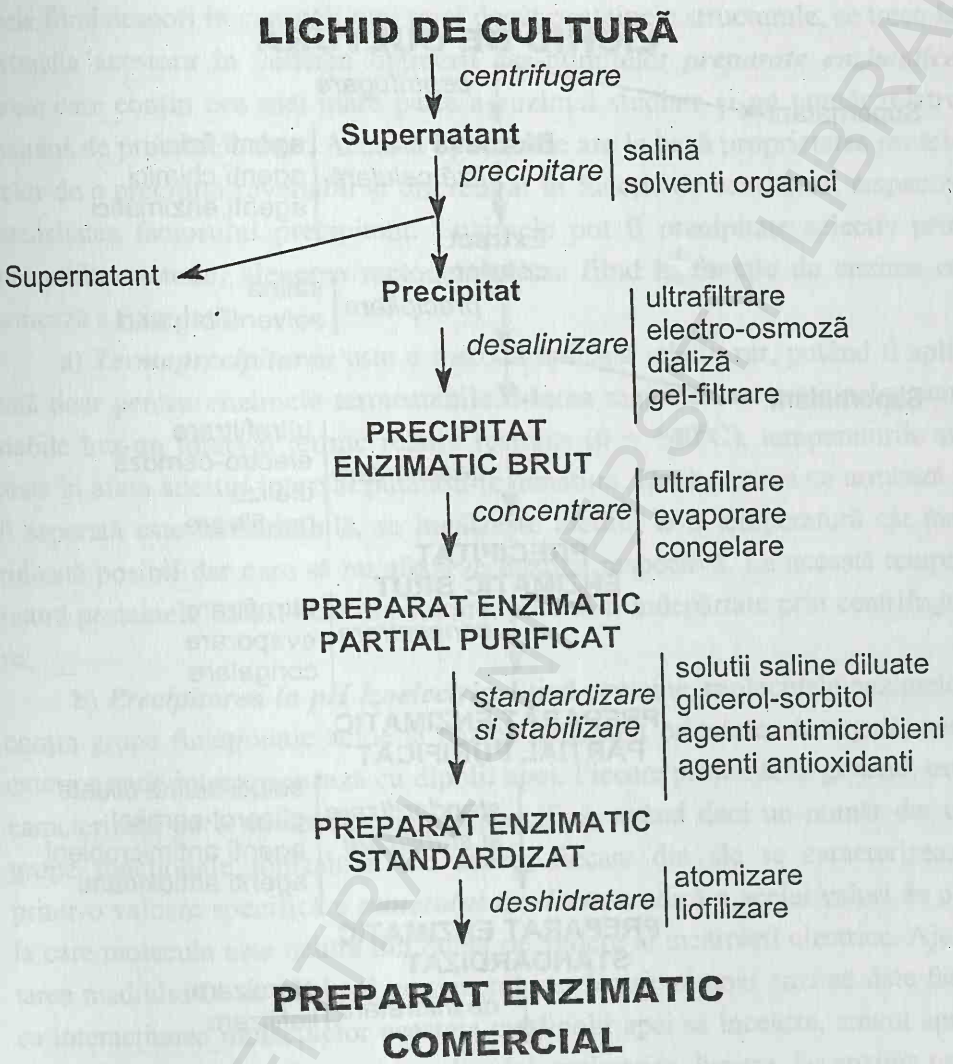


Fig. 108. Extracția și purificarea enzimelor microbiene extracelulare (Scriban, R. – 1995)

BCU IASI CENTRU VECHI LIBRARY

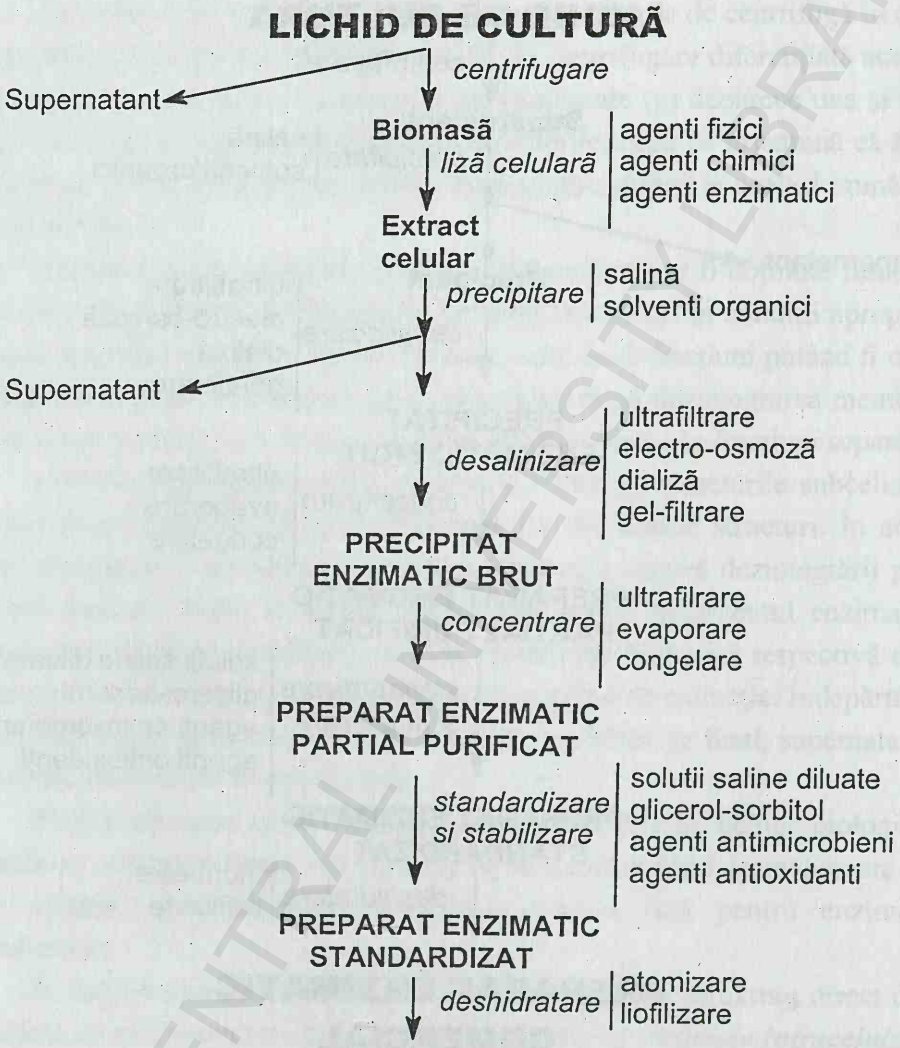


Fig. 109. Extracția și purificarea enzimelor microbiene intracelulare (Scriban, R. – 1995)

Metode de extracție a enzimelor. Condiții optime de extracție

Lichidele biologice, precum și supernatantele obținute după solubilizarea enzimelor membranare, se tratează în continuare în mod asemănător. Deoarece mediile respective conțin un număr foarte mare de proteine, enzi-

BCU IAȘI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

mele fiind deseori în cantități mai mici decât proteinele structurale, se trece la extracția acestora în vederea obținerii așa-numitelor ***preparate enzimatice brute*** care conțin cea mai mare parte a enzimei studiate și un număr relativ restrâns de proteine balast. Această operațiune are la bază proprietatea proteinelor de a precipita reversibil și diferențiat în funcție de cantitatea, respectiv intensitatea factorului precipitant. Enzimele pot fi precipitate selectiv prin mai multe metode, alegerea metodei optime fiind în funcție de enzima ce urmează a fi izolată.

a) ***Termoprecipitarea*** este o metodă aplicată relativ rar, putând fi aplicată doar pentru enzimele termostabile. Marea majoritate a proteinelor sunt stabile într-un interval termic relativ restrâns (0 ÷ +40°C), temperaturile situate în afara acestui interval putându-le denatura. Dacă enzima ce urmează a fi separată este termostabilă, se încălzește mediul la o temperatură cât mai ridicată posibil dar care să nu afecteze enzima respectivă. La această temperatură proteinele balast sunt denaturate, putând fi îndepărtate prin centrifugare.

b) ***Precipitarea la pH izoelectric.*** Fiind proteine, moleculele enzimelor conțin grupe funcționale acide și bazice care sunt orientate, de regulă, spre exterior unde interacționează cu dipolii apei. Fiecare proteină, în general, este caracterizată de o structură primară specifică, având deci un număr dat de grupe funcționale ionizabile. De aceea, fiecare din ele se caracterizează printr-o valoare specifică a ***punctului izoelectric***, adică a acelei valori de pH la care molecula este neutră din punct de vedere al încărcării electrice. Ajustarea mediului la un pH egal cu punctul izoelectric al unei enzime date face ca interacțiunea moleculelor acesteia cu dipolii apei să înceteze, stratul apos din micromediul imediat vecin moleculei enzimatice dispare, iar enzima precipită.

Grupele funcționale polare, valoarea punctului izoelectric și comportarea acido-bazică a unei enzime pot fi determinate prin trasarea curbei de titrare potențiometică. În general, enzimele au valori diferite ale pH-ului lor izoelectric. De exemplu, pentru catalază pI=5,4; pepsina are pI=1,0; elastaza are pI=8,5; iar punctul izoelectric al lizozimului (muramidaza) din ouă este la pH=11,0.

c) ***Precipitarea cu solvenți organici*** se bazează pe proprietatea acestora de a diminua valoarea constantei dielectrice a mediului cu repercusiuni asupra forțelor de atracție coulombiană dintre radicalii polari ai enzimei. În me-

diu apos, forțele de atracție dintre moleculele de protein-enzimă datorate grupelor ionizate cu sarcini electrice de semn contrar sunt anulate prin interacțiunea acestora cu moleculele de apă care se comportă ca un dipol datorită electronilor neparticipanți ai atomului de oxigen şi caracterului electropozitiv al atomilor de hidrogen.

Prin adăugarea solvenților organici, are loc o diminuare treptată a numărului moleculelor de apă din stratul imediat înconjurător moleculelor enzimatice şi scăderea constantei dielectrice a mediului. Grupele polare sunt astfel eliberate putându-şi exercita forța de atracție electrostatică, iar proteinele precipită.

d) ***Precipitarea cu săruri neutre*** se bazează pe solubilitatea diferită a proteinelor în general şi a enzimelor în special în soluții saline. Reprezentarea grafică a solubilității unei proteine în funcție de concentrația sării are aspectul unui clopot. Aceasta înseamnă că la concentrații mici ale sării solubilitatea proteinelor creşte până la o anumită valoare cu creşterea concentrației în sare după care diminuează treptat. Deci, la concentrații saline mari, proteinele precipită din soluții putând fi separate prin centrifugare.

Deoarece fiecare proteină precipită la o anumită concentrație a sării, este posibilă realizarea unei precipitări fracționate a proteinelor dintr-un lichid biologic. Nu orice sare poate fi însă utilizată în precipitarea fracționată a proteinelor. Pentru a fi un bun agent precipitant, o sare trebuie să îndeplinească următoarele condiții:

a) să posede o solubilitate mare în aşa fel încât să se poată realiza o gamă largă de concentrații;

b) dizolvarea sării respective în apă nu trebuie să modifice pH-ul şi temperatura soluției (să nu fie un proces exoterm);

c) să nu reacționeze cu proteinele şi să poată fi îndepărtată prin metode obişnuite (de exemplu prin dializă).

Cel mai adesea se utilizează în acest scop sulfatul de amoniu, amestecul sulfat monopotasic şi bipotasic, sulfatul de magneziu ş.a. De regulă, concentrația sării în cazul precipitării fracționate a proteinelor nu se exprimă procentual (g substanță la 100 g soluție) ci în procente de saturație. Pentru aceasta se prepară mai întâi o soluție saturată după care, în funcție de metodă, se adaugă această soluție la lichidul biologic şi nu sarea cristalină, până la un procent de saturație dat. În literatura de specialitate ce abordează metode practice de enzimologie, se găsesc nomograme cu ajutorul cărora se poate calcula canti-

tatea de sare ce trebuie adăugată la 1000 ml soluție pentru a obține un anumit procent de saturație.

V.3 PURIFICAREA ENZIMELOR

Preparatele enzimatice obținute prin una din metodele descrise mai sus prezintă un grad mic de purificare, necesitând operații ulterioare prin care să se mărească puritatea acestora. În cazul obținerii preparatului enzimatic brut prin precipitare fracționată cu săruri neutre, acesta se află sub formă de precipitat, operația următoare constând, în mod obligatoriu în îndepărtarea ionilor sării. Aceasta se poate realiza prin mai multe metode, cel mai adesea utilizându-se dializa.

V.3.1 Dializa

Dializa este o metodă des utilizată în biochimie în general și enzimologie în special. Prin această metodă se pot separa biomoleculele cu mase moleculare mari de compușii chimici obișnuiți cum ar fi sărurile. Preparatele enzimatice obținute prin precipitare cu săruri se introduc în tuburi de dializă care sunt reprezentate de tuburi confecționate din celofan sau dintr-o altă membrană semipermeabilă. Se leagă tubul la capete și se introduce într-un vas ce conține un volum mare dintr-un lichid față de care se realizează dializa. Mărimea porilor membranei semipermeabile nu permite trecerea macromoleculelor, în schimb ionii sării sunt eliminați treptat în lichidul exterior. Dată fiind concentrația relativ crescută a sării cu care s-a realizat precipitarea, dializa nu se realizează direct față de apă distilată. În acest caz, datorită efectului Donnan, ar avea loc o distribuție inegală a ionilor care ar determina o acidifiere a mediului intern, în paralel cu alcalinizarea mediului extern (fig. 110).

Această acidifiere a mediului intern poate determina denaturarea enzimei. Pentru a înlătura acest efect, dializa se execută mai întâi față de o soluție tampon adecvată (24 de ore), apoi față de apă de robinet în flux continuu (24-48 de ore) și în final față de apă distilată (24 de ore prin schimbarea periodică a acesteia).

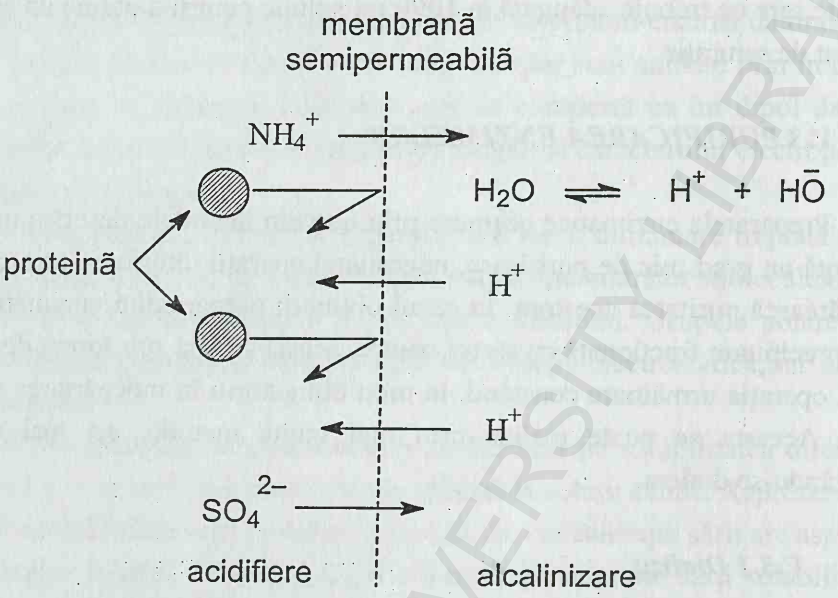


Fig. 110. Efectul Donnan în cazul dializei față de apă distilată

V.3.2 Purificarea enzimelor prin gel-cromatografie

În gel-cromatografie, componentele amestecului ce urmează a fi separate, migrează cu viteze diferite printr-un strat cromatografic, viteza de migrare depinzând de efectul repartiției lor între faza lichidă şi cea staționară. Stratul cromatografic este reprezentat de un gel cu o structură tridimensională caracteristică, insolubil.

Coeficientul de partiție al unui solvent între faza solidă şi cea lichidă este dependent exclusiv de efectele sterice, acest lucru stând la baza mecanismului gel-cromatografiei. Moleculele mici pătrund în porii gelului, în timp ce substanțele cu masă moleculară mare neputând penetra în ochiurile rețelei tridimensionale, au viteze mari de eluție, părăsind reticulul gelului mai repede. Caracterizarea suportului se face prin doi parametri:

a) ***geometria stratului cromatografic*** care se referă la înălțimea şi diametrul acestuia. Volumul total al suportului se calculează ca fiind egal cu volumul coloanei cromatografice (care are formă cilindrică):

$$V_t = \pi R^2 h$$

Volumul spațiului gol (V_o) care este volumul dintre granulele gelului, se determină cu ajutorul unor substanțe ce nu sunt reținute de gel, prin evaluarea volumului lor de eluție. Prin diferență, se determină volumul stratului cromatografic:

$$V_x = V_t - V_o$$

Volumul lichidului din interiorul particulelor de gel (volumul interior V_i) se determină ca fiind diferența dintre volumul gelului umflat (hidratat) și volumul parțial al suportului:

$$V_i = V_x - m_g V_g$$

unde:

m_g - masa gelului din strat;

V_g - volumul specific al acestuia.

Acest volum mai poate fi determinat și prin relația $V_i = m_g W_r$, unde W_r este capacitatea de reținere a apei de către gelul uscat;

b) ***viteza de eluție*** este parametrul ce caracterizează eluția stratului cromatografic și se exprimă prin ml/min sau ml/oră. Volumul de eluție, V_e, se definește ca fiind volumul eluatului necesar pentru a transporta moleculele unei substanțe date prin coloana cromatografică. Între volumul de eluție și coeficientul de partiție K între cele două faze se poate scrie relația:

$$V_e = V_o + K v_s$$

în care V_s este volumul fazei staționare. Atunci când întregul gel este considerat fază staționară, coeficientul de partiție este:

$$K = \frac{V_e - V_o}{V_x}$$

iar dacă faza staționară este considerată a fi doar lichidul care îmbibă gelul, coeficientul de partiție este:

$$K = \frac{V_e - V_o}{V_i}$$

Pentru a putea fi utilizat în gel-cromatografie, un gel trebuie să prezinte următoarele proprietăți:

- să fie inert chimic;
- să fie stabil din punct de vedere fizico-chimic;

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

- să conțină un număr cât mai mic posibil de grupări polare pentru a evita efectele de schimb ionic;

- să permită obținerea unei game largi de porozitate pentru a acoperi un domeniu cât mai larg de fracționare;

- porozitatea să poată fi riguros controlată;

- să fie rigid și să opună rezistență la eluție.

În acest tip de cromatografie, cel mai adesea se utilizează gelurile pe bază de dextran, cum ar fi de exemplu *Sephadex*-urile produse de firma *Pharmacia Fine Chemicals*, gelurile pe bază de poliacrilamidă (de exemplu gelurile de tip *Bio-Gel* produse de firma *Bio-Rad*), cele pe bază de agar și agaroză (*Sagavac, Sepharose, Gelarose* etc.) și altele.

V.3.3 Fracționarea enzimelor cu ajutorul schimbătorilor de ioni

Datorită prezenței în structura apoenzimelor a resturilor de aminoacizi diamino-monocarboxilici, monoamino-dicarboxilici, hidroxi-aminoacizilor etc., moleculele enzimatice prezintă la suprafața lor o serie de grupe polare ale căror natură și număr diferă de la o enzimă la alta. Datorită acestei caracteristici, enzimele mai pot fi purificate și prin fracționare cromatografică pe schimbători de ioni. Aceștia sunt reprezentați de unele substanțe insolubile care conțin grupe încărcate electric ce fac parte din structura lor și ioni de schimb mobili.

Cromatografia pe schimbători de ioni se bazează pe capacitatea ionilor mobili de a fi schimbați reversibil cu alți ioni încărcați cu sarcini electrice de același semn, fără ca matricea suportului să sufere modificări fizico-chimice. În funcție de natura acestor sarcini, schimbătorii de ioni pot exista sub două forme:

- ***schimbători de anioni (anioniți)*** care au grefate grupări polare pozitive pe o matrice insolubilă, ionii de schimb fiind negativi;

- ***schimbători de cationi (cationiți)*** în care ionii de schimb sunt încărcați cu sarcini pozitive, grupările polare ale suportului fiind încărcate negativ.

În calitate de suport pot fi utilizate rășini sintetice schimbătoare de ioni, silicați, polizaharide modificate etc. Capacitatea unui schimbător de ioni de a-și schimba ionii săi mobili cu ionii din mediu poartă numele de ***capacitate de schimb*** și depinde de numărul de grupe polare raportat la 1 gram substanță

uscată, de accesibilitatea acestora, de natura ionilor de schimb, de natura chimică, forța ionică și pH-ul eluantului etc.

În procesul de separare cromatografică a unui amestec de proteine pe o coloană cu schimbători de ioni are loc un fenomen de adsorbție reversibilă a fracțiunilor proteice. Fracționarea se realizează în funcție de încărcarea electrică a fiecărei proteine în parte, iar îndepărtarea lor treptată se face cu un eluant adecvat. Metoda eluției în gradient este una din metodele cel mai des utilizate.

Printre suporturile frecvent utilizate în cromatografia prin schimb ionic se numără ***aluminosilicații*** și ***hidroxizii de fier*** și ***aluminiu*** în calitate de suporturi anorganice, iar schimbătorii de ioni organici cei mai adecvați sunt unii derivați ai celulozei (***AE-celuloza, DEAE-celuloza, TEAE-celuloza, PAB-celuloza, ECTEOLA-celuloza, CM-celuloza, P-celuloza, SE-celuloza*** etc.), diferite tipuri de Sephadex (***DEAE-Sephadex, CM-Sephadex, SP-Sephadex*** etc.), unii copolimeri ai stirenului cu divinilbenzenul, ai acidului metacrilic cu divinilbenzenul și altele.

V.3.4 Fracționarea enzimelor cu ajutorul adsorbanților

Acest tip de fracționare reprezintă o altă variantă a cromatografiei solid-lichid, separarea depinzând de echilibrul ce se stabilește la interfață și de solubilitatea relativă a fracțiunii enzimatice respective. La baza acestei metode stă adsorbția enzimei ce urmează a fi purificată pe un suport datorită grupelor polare, forțelor van der Waals, interacțiunilor dipol-dipol, punților de hidrogen etc. În procesul adsorbției se instalează un echilibru între moleculele proteice adsorbite și cele libere, masa de solut adsorbită de unitatea de masă a suportului fiind descrisă de ecuația Langmuir:

$$m = \frac{K_1 \cdot K_2 c}{1 + K_2 c}$$

în care:

K_1 - numărul centrilor de adsorbție din unitatea de masă a adsorbantului;

K_2 - constantă ce descrie gradul de afinitate a solutului față de adsorbant;

c - concentrația solutului.

Materialele adsorbante cel mai des utilizate sunt ***alumina, gelul de fosfat de calciu, hidroxiapatită*** și altele.

V.3.5 Separarea enzimelor prin cromatografia de afinitate

O altă metodă des utilizată în purificarea enzimelor este cromatografia de afinitate care are la bază interacțiunea biospecifică a acestor compuși față de anumiți liganzi. Suportul se formează prin imobilizarea prin legare covalentă a unui anumit ligand pe un suport insolubil cu formarea unui adsorbant de afinitate. Prin trecerea amestecului proteic printr-o coloană umplută cu un astfel de adsorbant, enzima ce urmează a se purifica este adsorbită datorită interacțiunilor specifice cu ligandul, celelalte fracțiuni trecând libere prin coloană. După fracționare, enzima poate fi eluată fie specific, de exemplu cu o soluție a substratului ei natural, fie nespecific cum ar fi în cazul modificării pH-ului sau concentrației eluantului.

Suportul insolubil inert utilizat în cromatografia de afinitate, poate fi reprezentat de ***agaroză, celuloză, sticlă poroasă***, granule de ***poliacrilamidă, dextrani reticulați*** etc.

În etapele finale ale purificării enzimelor se pot folosi: ***electroforeza preparativă*** în gel de poliacrilamidă, ***izoelectrofocusarea*** prin electroforeză în gradient de pH și alte metode.

V.4 CRISTALIZAREA ENZIMELOR

Odată cu creșterea gradului de puritate al unei enzime crește puternic și labilitatea acestora, atât față de temperatură cât și față de pH-ul mediului de stocare sau alți factori. De aceea, după obținerea unui grad de puritate convenabil, preparatele enzimatice nu se stochează sub formă de soluții (cu câteva excepții când există stabilizatori specifici hidrosolubili ai anumitor enzime). De cele mai multe ori enzimele se cristalizează în vederea stocării, prin această operațiune realizându-se și o etapă suplimentară de purificare.

Există mai multe metode de cristalizare a enzimelor, cea mai frecvent utilizată fiind cristalizarea cu ajutorul sulfatului de amoniu sau a solvenților polari cum ar fi alcoolii. Cristalizarea cu sulfat de amoniu se face la rece (0-

4°C) prin adăugarea treptată a sării sau a unei soluții saturate, sub agitare continuă, până la apariția unei turbidități.

Suspensia se lasă apoi câteva ore (în unele cazuri câteva zile sau chiar săptămâni) la rece pentru maturarea cristalelor. În cazul cristalizării enzimelor cu ajutorul solvenților organici polari (de exemplu etanol) operațiunile se execută, de asemenea, la rece după ce solventul a fost răcit în prealabil la -10°C sau chiar mai mult. Formele cristalelor diferă de la o enzimă la alta sau depind de sursa biologică, procedeul de purificare utilizat, agentul de cristalizare, pH-ul mediului de cristalizare etc.

Deşi enzimele pure sunt mult mai instabile decât cele aflate în mediul lor natural, ele sunt totuşi mai stabile decât preparatele enzimatice brute. Enzimele cristaline se pot păstra la rece (0-4°C) un timp relativ îndelungat fără pierderea activității catalitice. Dacă deshidratarea se face prin liofilizare, stocarea se face, de asemenea la rece, dar în absența totală a umidității. Enzimele aflate în soluții se păstrează foarte bine la congelator dar înghețarea-dezgheţarea repetată determină o inactivare destul de rapidă. Din această cauză, acestea se stochează în frigider (0-4°C) după ce s-a adăugat un stabilizator adecvat.

V.5 DETERMINAREA ACTIVITĂȚII ENZIMATICE

Determinarea activității catalitice a unei enzime poate fi evidențiată fie prin evaluarea consumului de substrat, fie prin evaluarea produsului de reacție format. Pentru marea majoritate a enzimelor, viteza de reacție este o funcție liniară de timp doar pentru primele minute de reacție. Din această cauză, determinarea activității enzimelor se face prin efectuarea transformării respective în condiții optime de reacție într-un interval de timp în care această dependență este liniară.

După scurgerea acestui interval de timp se stopează reacția enzimatică printr-o modalitate sau alta după care se determină fie concentrația substratului (substratelor), fie a produsului (produşilor) de reacție prin metode fizico-chimice specifice. Crearea condițiilor optime de reacție înseamnă crearea unor condiții de pH, temperatură, presiune osmotică, raport masic enzimă/substrat etc., care să fie cât mai apropiate posibil de condițiile naturale, adică de condițiile pe care enzima le întâlneşte *in vivo*. În funcție de proprietățile fizico-chimice ale substratelor sau produşilor de reacție, metodele de

determinare a activității enzimelor se împart în mai multe grupe: metode spectrofotometrice, fluorimetrice, titrimetrice, calorimetrice, polarimetrice, radiometrice etc.

V.5.1 Metode spectrofotometrice de determinare a activității enzimelor

Aceste metode se bazează pe proporționalitatea care există între extincția E (sau densitatea optică D.O.) a unei soluții şi produsul dintre concentrația soluției respective (c) şi drumul optic (d) adică grosimea stratului de soluție pe care lumina o străbate:

$$\mathbf{E\ (sau\ D.O.) = \varepsilon \cdot c \cdot d}$$

unde ε este ***coeficientul de extincție molară***, adică extincția substanței respective aflată în soluție într-o concentrație de 1 molar atunci când drumul optic este de 1 cm. Pe de altă parte, valoarea extincției este dată de relația:

$$E = \log\frac{I_o}{I} = -\log T$$

unde:

I_o - intensitatea luminii incidente;

I - intensitatea luminii transmise;

T - transmisia.

Ținând cont de aceste relații, unitatea de măsură a coeficientului de extincție molară este:

$$\varepsilon = \frac{\log\frac{I_o}{I}}{c \cdot d} = \frac{1}{\frac{mol}{cm^2} \cdot cm} = \frac{cm}{mol}$$

Cea mai mare sensibilitate în determinarea unui compus prin metode spectrofotometrice se situează la lungimea de undă corespunzătoare absorbției maxime. De aceea, determinările se fac la lungimi de undă bine stabilite în funcție de spectrul de absorbție, aceste metode fiind pe deplin realizabile deoarece este practic imposibil ca atât substratul cât şi produsul de reacție să posede acelaşi spectru de absorbție. În multe situații se determină direct ex-

BCU IASI CENTRALA UNIVERSITARA LIBRARY

tincția substratului sau a produsului de reacție la o lungime de undă bine determinată, situată în ultraviolet, domeniul vizibil sau chiar domeniul infraroșu. De foarte multe ori însă, se folosesc metode în care substratul sau produsul de reacție formează complecși colorați cu reactivi specifici, iar intensitatea culorii este direct proporțională cu concentrația substanței respective. În asemenea situații se determină densitatea optică a acestui compus colorat la o lungime de undă din domeniul vizibil. Calculul rezultatelor în toate metodele spectrofotometrice, se face, fie prin utilizarea unei soluții etalon (standard), fie prin trasarea unei curbe de etalonare.

V.5.2 Metode fluorimetrice de determinare a activității enzimelor

Aceste metode de analiză sunt extrem de sensibile deoarece pot fi înregistrate modificări ale emisiei spectrale chiar la concentrații foarte mici ale substanțelor analizate. Metodele fluorimetrice de dozare se pot utiliza atunci când fie substratul, fie produsul de reacție, fie cofactorul enzimatic prezintă proprietăți fluorescente. De exemplu, activitatea dehidrogenazelor FAD-dependente poate fi determinată cu mare exactitate prin metode fluorimetrice deoarece coenzimele flavinice sunt fluorescente în stare oxidată. Proprietățile fluorescente dispar prin reducerea lor în procesele redox pe care le catalizează flavoenzimele.

V.5.3 Metode titrimetrice de determinare a activității enzimelor

Există reacții enzimatice când substratul sau produsul de reacție prezintă caracter acid sau bazic putând fi dozat prin titrare. De exemplu lipaza, acționând asupra triacilglicerolilor, hidrolizează acest substrat cu formare de glicerină și acizi grași liberi. Concentrația acestora poate fi apoi determinată prin titrare cu o soluție alcalină de titru cunoscut. Aria de aplicabilitate a acestor metode este totuși destul de restrânsă deoarece formarea unor produși de reacție cu caracter acid sau alcalin determină modificarea pH-ului mediului de incubare cu repercusiuni asupra capacității catalitice a enzimei respective.

V.5.4 Metode calorimetrice

Aceste metode de determinare a activității enzimelor se bazează pe măsurarea căldurii de reacție ca o măsură a vitezei cu care substratul este modificat enzimatic, atunci când reacția este exotermă. Și aceste metode sunt puțin utilizate deoarece eliberarea unei anumite cantități de căldură modifică condițiile de temperatură ale incubației, reacția enzimatică decurgând în continuare în condiții termice diferite de cele optime.

V.5.5 Metode polarimetrice

Datorită faptului că foarte multe biomolecule prezintă activitate optică determinată de prezența unuia sau mai multor atomi de carbon chirali, aceste metode de determinare a activității unor enzime se bazează pe măsurarea unghiului sub care soluția substratului sau a produsului de reacție rotește planul luminii polarizate. Metodele polarimetrice de analiză se pot aplica în enzimologie în trei situații:

a) substratul reacției este optic activ, iar produsul este optic inactiv;

b) produsul de reacție este optic activ, iar substratul nu prezintă activitate optică;

c) atât substratul cât și produsul transformării enzimatice prezintă activitate optică, dar rotațiile lor specifice sunt diferite.

Pentru determinarea activității unor enzime se mai folosesc ***metode radiometrice, metode cu enzime imobilizate, metode cu kit-uri de reactivi*** și altele.

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

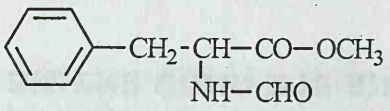
VI. MECANISMELE DE ACȚIUNE ALE UNOR ENZIME

Deşi reacţiile biochimice catalizate de enzime, atât *in vivo* cât şi *in vitro*, se încadrează în şase mari grupe (reacţii redox, de transfer, de hidroliză, eliminare şi/sau adiţie, izomerizare şi respectiv de sinteză cu formarea unor noi legături covalente) mecanismele de reacţie sunt extrem de diferite chiar şi pentru enzimele ce catalizează acelaşi tip de reacţie. Pe de altă parte, până în prezent nu s-a reuşit elucidarea mecanismelor de reacţie pentru toate enzimele cunoscute. Cu toate acestea se pot găsi etape comune ale diferitelor transformări enzimatice, mai cu seamă pentru enzimele bicomponente care conţin acelaşi cofactor.

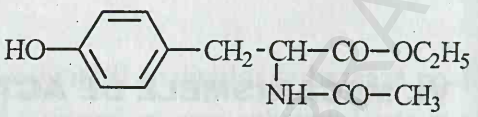
VI.1 MECANISME DE ACȚIUNE ALE UNOR ENZIME MONOCOMPONENTE

Din grupa enzimelor cu structură holoproteică, în prezent sunt bine studiate sub aspectul mecanismului de acţiune tripsina, chimotripsina, aldolaza etc.

a) ***Chimotripsina*** (EC 3.4.21.1). Dintre toate enzimele cunoscute în prezent, chimotripsina este, probabil, enzima cea mai intens studiată sub aspectul mecanismului ei de acţiune. Această enzimă scindează hidrolitic legăturile peptidice formate de aminoacizii aromatici fenilalanină, tirozină şi triptofan, specificitatea de substrat manifestându-se faţă de nucleul benzenic al acestor aminoacizi. Chimotripsina hidrolizează în egală măsură unii esteri, amide, hidroxamaţi şi alţi derivaţi cu masă moleculară mică ce conţin nuclee aromatice. Din aceste motive, pentru studiul mecanismului de acţiune al acestei enzime se utilizează deseori substrate sintetice cum ar fi unii esteri ai tirozinei acilate la nivelul grupării sale aminice. Se pare că prezenţa restului de tirozină acilată la azotul aminic este esenţială pentru activitatea hidrolazică a chimotripsinei. Cel mai adesea se utilizează esterii metilic şi respectiv etilic ai tirozinei sau fenilalaninei acilate:



esterul metilic al
N-formil-fenilalaninei



esterul etilic al
N-acetil-tirozinei

Numai izomerii levogiri ai acestor compuşi pot servi drept substrate pentru chimotripsină, în timp ce izomerii dextrogiri sunt atacaţi foarte slab. Aceasta înseamnă că enzima manifestă ***stereospecificitate***. Pentru manifestarea activităţii catalitice de către chimotripsină, este necesară îndeplinirea a două condiţii principale:

- substratul trebuie să formeze cu enzima maximum de legături posibile sau, altfel spus, legarea sa de centrul activ al enzimei trebuie să producă variaţia de entropie liberă (ΔG) cea mai mare posibilă. În felul acesta afinitatea dintre enzimă şi substrat creşte, ceea ce presupune o valoare mică a constantei K_M;

- legăturile din molecula substratului ce urmează a fi scindate de enzimă (legătura amidică sau esterică) trebuie să se localizeze de o anumită manieră din punctul de vedere al orientării şi distanţei faţă de grupele funcţionale ale centrului activ, încât să se obţină o valoare crescută a parametrului V_{max}.

Centrul activ al chimotripsinei este format din resturile aminoacizilor His_{57}, Asp_{102} şi Ser_{195}. Într-o primă fază a reacţiei, donorul de grupări acil (substratul), formează legături de hidrogen cu resturile His_{57} şi Asp_{102}, aceste punţi de hidrogen facilitând atacul grupării alcoolice ionizate a restului de Ser_{195} asupra atomului de carbon carbonilic din structura substratului (vezi cap. II.3.3.). În această fază are loc acilarea enzimei în urma unui transfer de protoni facilitat de punţile de hidrogen nou formate. După formarea chimotripsinei acilate se eliberează produsul de reacţiei P_1 care este fragmentul peptidic cu capătul N-terminal nou format ($R\text{-}NH_2$). În faza următoare se realizează deacilarea enzimei când protonii apei asigură refacerea resturilor Asp_{102} şi His_{57}, iar anionii HO^- înlesnesc eliberarea celui de-al doilea produs care este fragmentul peptidic purtător al capătului C-terminal nou format (R'—COOH).

Mecanismul catalizei covalente şi al catalizei general bazice înlesnit de restul His_{57} nu explică însă viteza mare de reacţie întîlnită în acţiunea proteolitică a chimotrpsinei. Din aceste motive, unii autori presupun existenţa unei constante dielectrice mai mici decât a apei în micromediul centrului activ al enzimei. Această diminuare a constantei dielectrice determină o creştere a reactivităţii grupelor funcţionale implicate în acţiunea hidrolitică.

b) ***Tripsina*** (EC 3.4.21.4) este o proteinază digestivă ce catalizează scindarea hidrolitică a legăturilor peptidice din molecula substratului printr-un mecanism asemănător cu cel întâlnit la chimotripsină, cu deosebirea că specificitatea de substrat se referă la prezenţa unui rest de arginină sau lizină (sau altui rest cationic) în vecinătatea legăturii peptidice ce urmează a fi clivată. Tripsina mai poate hidroliza şi unele substrate sintetice cum ar fi unii esteri şi amide cu masă moleculară mică ce conţin o grupare funcţională încărcată pozitiv în vecinătatea legăturii vizate. Sarcina electrică (+) este esenţială pentru activitatea enzimatică, din care cauză aminele ionizate, ce conţin 2-4 atomi de carbon, sunt inhibitori pentru tripsină. Astfel propilamina ionizată este un inhibitor competitiv al tripsinei. Esterul etilic al N-acetil-glicinei este hidrolizat cu o viteză foarte mică (fig. 111). Viteza de reacţie se dublează însă în prezenţa propilaminei şi creşte de 9 ori în prezenţa etilaminei. *Imagami* şi *Murachi* explică această activare prin faptul că aceşti compuşi, luaţi împreună, imită esterul etilic al lizinei.

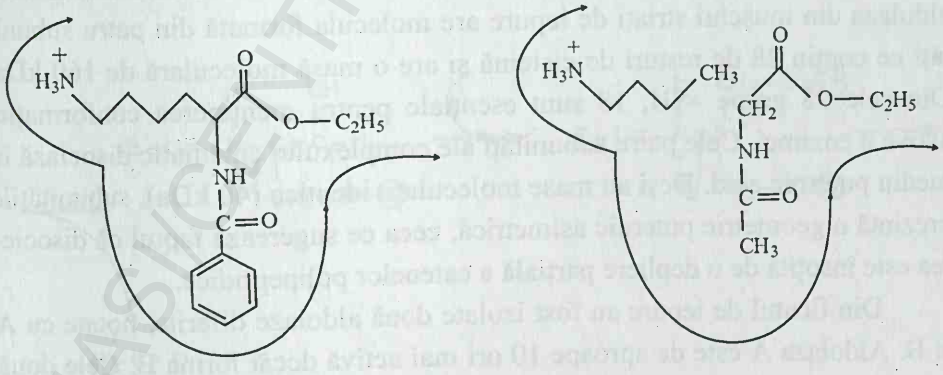
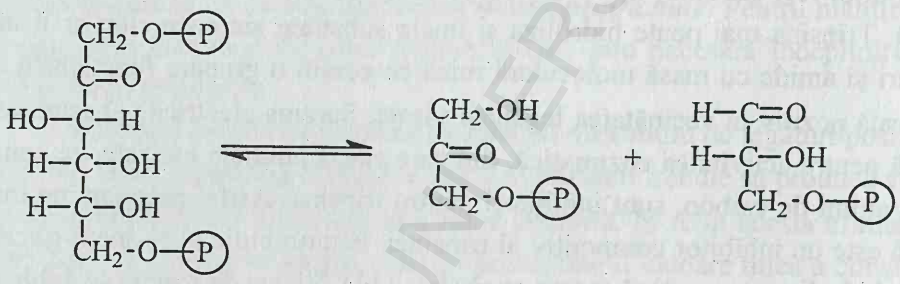


Fig. 111. Interacţiunea centrului activ al tripsinei cu esterul etilic al L-benzoil-L-lizinei (stânga) şi respectiv esterul etilic al N-acetil-glicinei în prezenţa propilaminei (dreapta)

Literatura de specialitate mai citează cazuri similare şi la alte enzime. În situaţia de faţă este posibil ca sarcina pozitivă să neutralizeze o sarcină negativă din centrul activ al enzimei care este restul Asp_{182}. Această neutralizare a grupării $-COO^-$ a restului aspartat provoacă o modificare conformaţională a situsului catalitic care se traduce printr-o activare a tripsinei.

c) *Aldolaza (D-fructozo-1,6-difosfat-D-gliceraldehid-3-fosfat-liaza*, EC 4.1.2.13) catalizează o etapă importantă a căii Embden-Meyerhoff-Parnas şi anume scindarea reversibilă a fructozo-1,6-difosfatului în cele două trioze fosforilate:



fructozo-1,6-difosfat — dihidroxiacetonfosfat — D-gliceraldehid-3-fosfat

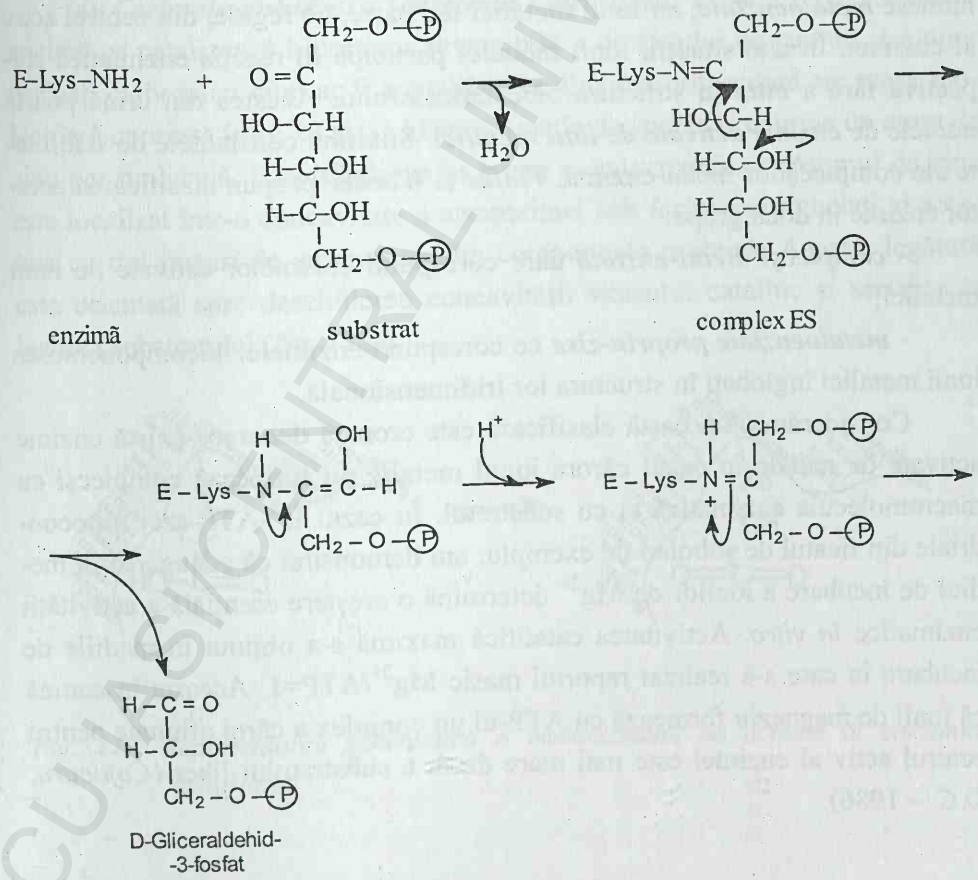
Aldolaza este o enzimă destul de intens studiată, atât sub aspect structural cât şi din punctul de vedere al mecanismului ei de acţiune. Astfel, aldolaza din muşchii striaţi de iepure are molecula formată din patru subunităţi ce conţin 28 de resturi de cisteină şi are o masă moleculară de 160 kDa. Din cele 28 grupe –SH, 18 sunt esenţiale pentru menţinerea conformaţiei active a enzimei. Cele patru subunităţi ale complexului enzimatic disociază în mediu puternic acid. Deşi au mase moleculare identice (40 kDa), subunităţile prezintă o geometrie puternic asimetrică, ceea ce sugerează faptul că disocierea este însoţită de o depliere parţială a catenelor polipeptidice.

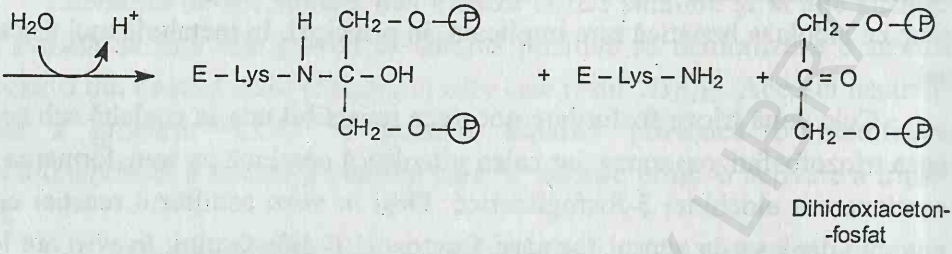
Din ficatul de iepure au fost izolate două aldolaze diferite, notate cu A şi B. Aldolaza A este de aproape 10 ori mai activă decât forma B. Cele două forme mai diferă şi din punctul de vedere al specificităţii de substrat, forma A scindând cu viteze egale atât fructozo-1-fosfatul cât şi fructozo-1,6-difosfatul faţa de aldolaza musculară care scindează esterul difosforic cu o viteză de 50 de ori mai mare. Aceste diferenţe de specificitate se explică prin rolul biochimic pe care îl joacă fiecare din cele două tipuri enzimatice: aldolaza mus-

culară este implicată preponderent în calea Embden – Meyerhoff – Parnas în timp ce aldolaza hepatică este implicată, în principal, în metabolismul fructozei.

Cele două trioze fosforilate pot trece reversibil una în cealaltă sub acțiunea triozofosfatizomerazei, iar calea glicolitică continuă cu transformarea în continuare a aldehidei 3-fosfoglicerice. Deşi *in vitro* echilibrul reacției este puternic deplasat în sensul formării fructozo-1,6-difosfatului, *in vivo* are loc scindarea acestei hexoze fosforilate deoarece gliceraldehid-3-fosfatul este îndepărtat în permanență din mediu prin continuarea glicolizei.

În prima etapă a reacției, fructoza difosforilată formează o bază Schiff cu gruparea ε-amino a unui rest de lizină din structura aldolazei. Complexul ES astfel format este deosebit de reactiv, scindându-se întâi aldehida-3-fosfoglicerică, apoi dihidroxiacetonfosfatul cu refacerea enzimei:





VI.2. MECANISME DE ACȚIUNE ALE UNOR METALOENZIME

Participarea ionilor unor metale în cataliza enzimatică poate avea loc într-o mare varietate de moduri. În unele cazuri, ionii metalici fac parte integrantă din structura enzimelor fiind legați de apoenzimele lor. Acestea se numesc ***metaloenzime***, iar ionii metalici fac parte, de regulă, din centrul activ al enzimei. În alte situații, ionii metalici participă în reacția enzimatică respectivă fără a intra în structura biocatalizatorului. Acestea din urmă poartă numele de ***enzime activate de ioni metalici***. Studiind constantele de stabilitate ale complecşilor metal-enzimă, *Vallee* şi *Wacker* propun clasificarea acestor enzime în două grupe:

- ***complecşi metal-enzimă*** care corespund enzimelor activate de ionii metalici;

- ***metaloenzime propriu-zise*** ce corespund enzimelor bicomponente cu ionii metalici înglobați în structura lor tridimensională.

Considerăm că această clasificare este eronată deoarece există enzime activate de metale în cazul cărora ionul metalic nu formează complecşi cu macromolecula enzimatică ci cu substratul. În cazul H^+-ATP-azei mitocondriale din ficatul de şobolan de exemplu, am demonstrat că adăugarea în mediul de incubare a ionilor de Mg^{2+} determină o creştere esențială a activității enzimatice *in vitro*. Activitatea catalitică maximă s-a obținut în mediile de incubare în care s-a realizat raportul masic Mg^{2+}/ATP=1. Aceasta înseamnă că ionii de magneziu formează cu ATP-ul un complex a cărui afinitate pentru centrul activ al enzimei este mai mare decât a substratului liber (*Cojocaru, D.C.* – 1986).

Şi alţi autori au obţinut rezultate asemănătoare, ceea ce ne face să susţinem ipoteza că în grupa ***enzimelor activate de ionii metalici*** intră toate enzimele a căror activitate catalitică creşte în prezenţa acestor ioni, indiferent dacă ionii metalici complexează enzimele sau substratele lor.

a) ***Carbonic-anhidraza*** (***carbonat hidro-liaza***, EC-4.2.1.1) este o Zn-enzimă ce catalizează hidratarea reversibilă a dioxidului de carbon şi a unor derivaţi carbonilici cum ar fi acetaldehida. Enzima eritrocitară are masa moleculară cuprinsă între 28 şi 31 kDa în funcţie de specie şi conţine un atom de zinc per moleculă, încadrându-se în grupa metaloenzimelor. Atomul de zinc este localizat într-o concavitate a apoenzimei sub forma unor chelaţi ai acestuia cu trei resturi de aminoacizi din componenta proteică. A patra legătură este orientată spre deschiderea concavităţii situsului catalitic şi serveşte la legarea substratului (fig. 112).

Fig. 112. Reprezentarea schematică a mecanismului de acţiune al carbonic-anhidrazei

Enzima conține un situs protonat şi un altul neprotonat, aflate într-un echilibru permanent, fapt ce explică reversibilitatea reacției. Situsul neprotonat este responsabil de reacția de hidratare, iar cel protonat este activ în reacția de deshidratare. Prin studii privind modul de acțiune al diferiților inhibitori, *Colemann* consideră că forma activă a enzimei pentru reacția de hidratare a CO_2 este:

Apoenzimă-Zn-OH

Pentru acest sens al reacției, molecula de CO_2 (substratul) nu este coordinată la ionul metalic ci se leagă prin interacțiuni hidrofobe într-o zonă a situsului catalitic imediat vecină cu ionul de zinc. Acest lucru este argumentat şi de faptul că azida de sodiu, care este un inhibitor pentru carbonic-anhidrază, se leagă coordinativ la ionul de Zn^{2+} împiedicând în felul acesta legarea CO_2, ceea ce demonstrează că molecula acestuia se află în imediata vecinătate a ionului metalic.

Pentru reacția inversă, ionul bicarbonat se leagă la atomul de zinc prin atomul său de oxigen încărcat negativ, iar restul moleculei este localizat în concavitatea hidrofobă a situsului activ.

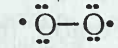
În timpul reacției se realizează un transfer de protoni concomitent cu scindarea legăturii C – O. Se eliberează în felul acesta o grupare –OH care este coordinată de ionul metalic.

b) Superoxid-dismutaza (***superoxid : superoxid - oxidoreductaza***, EC 1.15.1.1) este o enzimă întâlnită în toate organismele aerobe sau aerotolerante care se încadrează în grupa metaloenzimelor, molecula sa putând conține, în funcție de sursa biologică, fier, cupru, magneziu sau zinc.

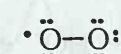
Enzima catalizează reacția de dismutare a ionilor superoxid, toxici pentru celula vie. Oxigenul molecular are o reactivitate scăzută (stare de triplet). Oxigenul poate însă exista şi într-o formă reactivă (singlet) când momentele de spin sunt de sens contrar, formă ce apare doar în cazuri particulare.

Reducerea oxigenului se realizează în mod treptat, fiind necesari patru protoni pentru a forma apa. Speciile moleculare toxice pentru celula vie sunt O_2^-, H_2O_2 şi HO^-, care apar ca produşi intermediari ai procesului reductiv (speciile în chenar sunt toxice):

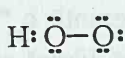
oxigen molecular

 sau O_2

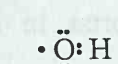
superoxid

 sau $O_2^{\cdot -}$

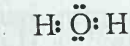
peroxid

 sau H_2O_2

radicali HO$^{\cdot}$

 sau $HO^{\cdot}$

apă

 sau H_2O

De fiecare dată când apare o sarcină negativă, ea este neutralizată de câte un proton, cu excepția anionului superoxid deoarece specia $O_2^{\cdot -}$ are caracter acid al cărui indice de aciditate se situează în jurul valorii 4,0. Din această cauză, la pH neutru se deprotonează, anionul superoxid putând fi considerat, în același timp, ca fiind un radical.

Radicalii superoxid apar în celula vie în urma activității oxidazelor FAD-dependente. De asemenea, citocromul P-450 determină apariția superoxidului și a peroxidului sub formă legată de fier. Se estimează că citocromul P-450 poate forma, de asemenea, oxigenul singlet în anumite condiții particulare.

Unele mono-oxigenaze, cum ar fi salicilat-hidroxilaza, pot genera în unele situații $O_2^{\cdot -}$ și H_2O_2. În fine, unii metaboliți pot fi oxidați direct de către oxigen prin mecanism radicalic generând radicali superoxid (cum se întâmplă în cazul acidului ascorbic, glutationului și în general al tiolilor, fenolilor, chinonelor respiratorii reduse etc.). Radicalii superoxid au o viață foarte scurtă în apă, din care cauză, toxicitatea lor reală este încă controversată.

BCU "CAROL I" CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Peroxidul de hidrogen este mutagen, penetrând liber în celulă unde atacă bazele azotate ale moleculelor de ADN. În ultimul timp se crede că adevăratul pericol la care sunt supuse celulele vii îl reprezintă formarea radicalilor HO^* care pot să apară, de exemplu, în reacția Fenton, în prezența ionilor de fier:

$$H_2O_2 + O_2^- \xrightarrow{Fe^{3+}} HO^{\bullet} + HO^- + O_2$$

Din această cauză, ionii Fe^{2+} şi Fe^{3+} reprezintă o "amenințare" pentru celulele vii. De aceea, concentrația lor sub formă liberă este reglată la un nivel scăzut în celule şi lichidele biologice (în plasma sanguină fierul liber lipseşte). Din aceste motive, fierul este transportat în organism de către ***transferine*** şi stocat în ***feritină***.

O reacție asemănătoare are loc şi în prezența ionilor de mangan liberi:

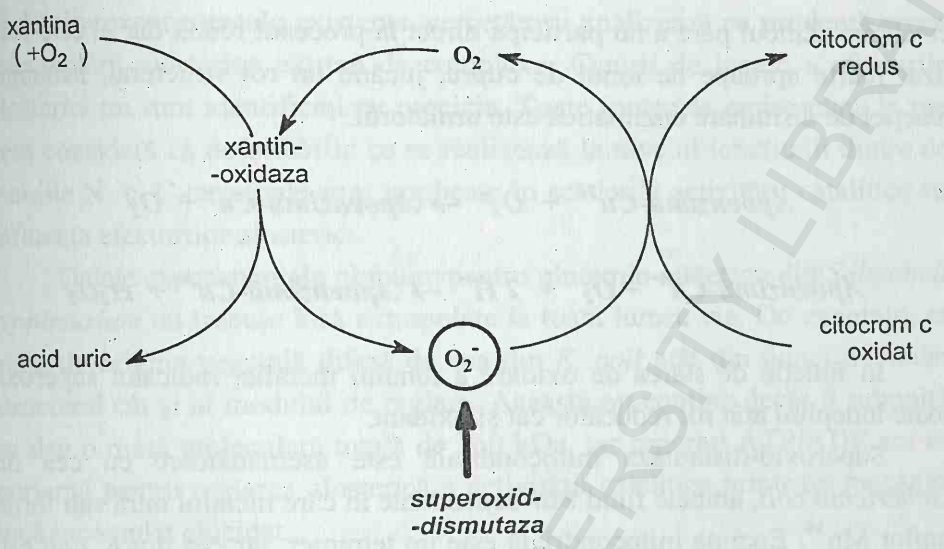
$$Mn^{2+} + O_2^- + 2H^+ \xrightarrow{Fe^{3+}} Mn^{3+} + H_2O_2$$

Ionii Mn^{3+} sunt stabilizați de diferite biomolecule, devenind agenți oxidanți foarte puternici.

Pentru dozarea activității superoxid-dismutazei este necesară utilizarea unui sistem generator de superoxid, acesta trebuie să reacționeze apoi cu un substrat oarecare, după care se evaluează inhibiția exercitată de superoxid-dismutază asupra reacției respective. Acest sistem stă la baza majorității metodelor utilizate în prezent.

De cele mai multe ori se utilizează xantin-oxidaza, o flavoenzimă care, oxidând xantina, generează continuu anionii superoxid. La rândul lui, anionul superoxid se comportă ca un agent reducător în tendința de a ceda electronul suplimentar. Dacă se foloseşte citocromul c drept acceptor, este suficientă observarea modificării spectrului. Prin adăugarea în mediul de incubare a superoxid-dismutazei se împiedică reducerea citocromului c:

BCU "CAROL I" TRANSILVANIA UNIVERSITY LIBRARY



Există numeroşi compuşi ce se pot oxida spontan cu eliberare de radicali superoxid. Acesta poate reacţiona la rândul său în mai multe moduri:

- cu el însuşi prin dismutare. Această reacţie poate avea loc şi necatalitic, dar este puternic accelerată de superoxid-dismutază;
- ca reducător al unor biomolecule, de exemplu al citocromului c;
- ca reducător al apei oxigenate (reacţia Fenton descrisă mai sus);
- ca oxidant: superoxidul trece în peroxid reacţionând cu o serie de biomolecule, ca de exemplu adrenalina. Oxidarea radicalică a acesteia conduce la apariţia unui compus colorat în roşu - ***adrenocromul***. Formarea acestuia este inhibată de superoxid-dismutază (această reacţie stând la baza unei metode foarte sensibile de determinare a activităţii acestei enzime).

În prezent se cunosc trei grupe de superoxid-dismutaze:

1) Cu-Zn-dismutaze (în plasmă)
2) Mn-dismutaze (în mitocondrii şi unele bacterii)
3) Fe-dismutaze (în periplasma bacteriană).

Superoxid-dismutaza Cu,Zn – dependentă a fost decelată prima dată în sângele de bou, ca fiind o heteroproteină cu masa moleculară de 35 kDa şi un conţinut în cupru de 0,38 %. Se deosebeşte de celelalte dismutaze prin sensibilitatea sa crescută faţă de cianuri. Molecula enzimatică este formată din două subunităţi identice, iar structura sa a fost elucidată prin metode cristalografice în raze X. Ionii de cupru sunt indispensabili activităţii catalitice în timp ce zincul poate fi înlocuit de cobalt sau mercur fără pierderea capacităţii

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

catalitice. Zincul pare a nu participa direct la procesul redox dar el este localizat foarte aproape de ionul de cupru, jucând un rol structural. Principiul reacției de dismutare enzimatică este următorul:

$$Apoenzimă\text{-}Cu^{2+} + O_2^- \rightarrow Apoenzimă\text{-}Cu^{+} + O_2$$

$$Apoenzimă\text{-}Cu^{+} + O_2^- + 2\,H^{+} \rightarrow Apoenzimă\text{-}Cu^{2+} + H_2O_2$$

În funcție de starea de oxidare a ionului metalic, radicalul superoxid poate îndeplini atât rol reducător cât și oxidant.

Superoxid-dismutaza mitocondrială este asemănătoare cu cea din *Escherichia coli*, ambele fiind Mn-dependente în care metalul intră sub forma ionilor Mn^{3+}. Enzima mitocondrială este un tetramer, iar cea din *E. coli* este un dimer.

*c) **Glutamin-sintetaza*** a fost studiată mai intens pentru enzima obținută din *Salmonella typhimurium* care are molecula formată din 12 subunități cu masele moleculare de 51 kDa. Subunitățile disociate nu prezintă activitate catalitică, aceasta fiind caracteristică doar ansamblului oligomer. Fiecare subunitate conține câte doi atomi de mangan esențiali pentru activitatea enzimatică. De asemenea, în fiecare subunitate au fost decelate două domenii ce joacă roluri diferite: zona N-terminală ce conține primele 104 resturi de aminoacizi este formată din două fragmente cu structură α-helicoidală și șase fragmente β-pliate; zona C-terminală conține 300 resturi de aminoacizi.

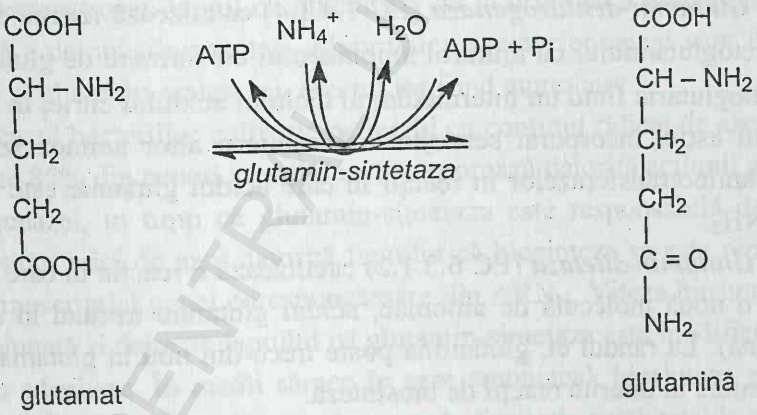
Restul de tirozină din poziția 397 este extrem de important, el intrând în structura situsului de adenilare. Atomii de zinc sunt înconjurați de fragmentele β-pliate. Conjuncția dintre cele două domenii se face printr-un fragment flexibil lipsit de punți disulfidice. La formarea centrului activ își aduc contribuția ambele domenii adiacente ale subunităților. Ionii de mangan sunt coordinați de patru resturi diferite de aminoacizi ai apoenzimei și sunt localizați în imediata apropiere a situsului catalitic.

Situsul de adenilare pare să dirijeze grupările sale ce leagă AMP-ul în direcția atomilor de mangan, grupări ce revin la poziția normală în absența substratului (ATP). Mai este posibil ca adenilarea să inducă apariția unor noi interacțiuni cu domeniul N-terminal al subunității adiacente care să confere ansamblului structural o rigiditate crescută. Datorită multitudinii și diversită-

ții datelor experimentale existente, cercetătorii analizează cu prudență procesele reglării alosterice extrem de complexe. Centrii de legare a efectorilor alosterici nu sunt identificați cu precizie. Toate ipotezele emise până în prezent consideră că deformările ce se realizează la nivelul joncțiunii dintre domeniile N- şi C-terminale sunt implicate în scăderile activității catalitice sub influența efectorilor alosterici.

Datele experimentale obținute pentru glutamin-sintetaza din *Salmonella typhimurium* nu trebuie însă extrapolate la toată lumea vie. De exemplu, enzima de origine vegetală diferă de cea din *E. coli* atât din punct de vedere structural cât şi al modului de reglare. Aceasta nu conține decât 8 subunități ce dau o masă moleculară totală de 360 kDa, iar raportul ATP/ADP are importanță pentru reglarea alosterică a activității catalitice printr-un mecanism încă incomplet elucidat.

Glutamin-sintetaza din *Eschericiha coli* catalizează reacția de aminare reductivă a acidului glutamic conform reacției:



glutamat glutaminā

Azotul intră în metabolismul celular sub forma cationului NH_4^+, iar includerea sa în scheletul hidrocarbonat al glutamatului necesită prezența a trei enzime cheie (fig. 113).

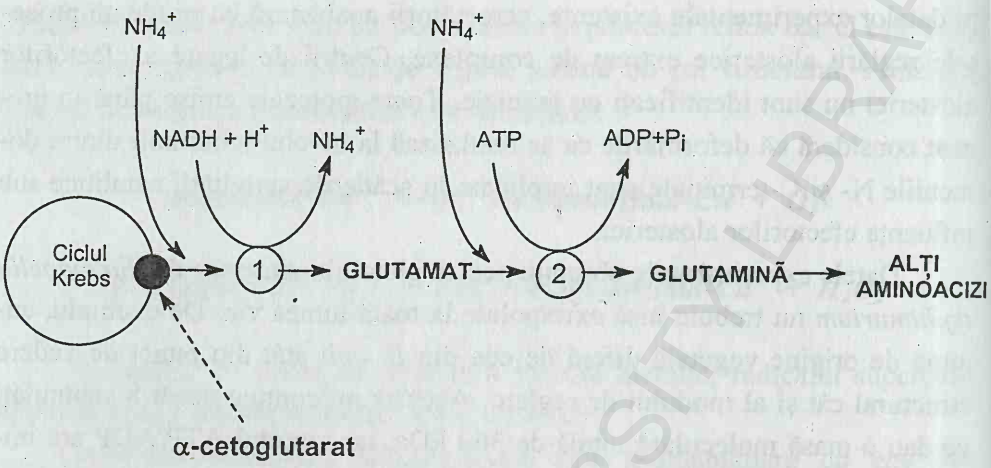


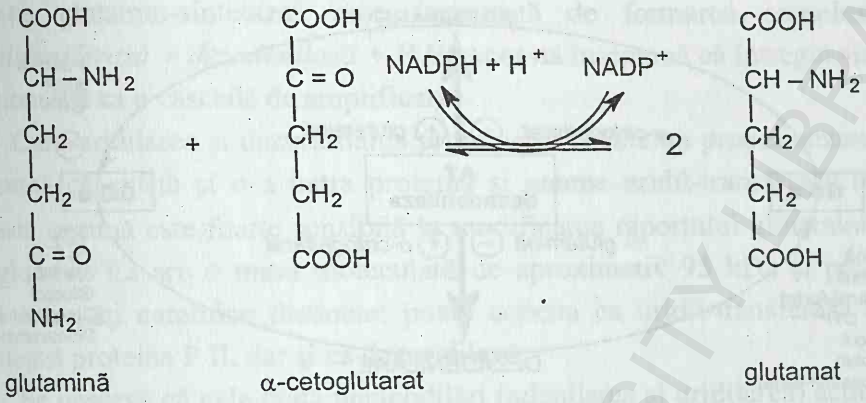
Fig. 113. Schema generală de includere a amoniacului în aminoacizi
1 – glutamat-dehidrogenaza
2 – glutamin-sintetaza

1. Glutamat-dehidrogenaza (EC 1.4.1.4) catalizează reacția de reducere a α-cetoglutaratului cu ajutorul amoniacului cu formare de glutamat, acidul α-cetoglutaric fiind un intermediar al ciclului acidului citric. În continuare, azotul astfel încorporat serveşte la biosinteza altor aminoacizi datorită acțiunii aminotransferazelor în reacții în care acidul glutamic este donor de grupe $-NH_2$.

2. Glutamin-sitetaza (EC 6.3.1.2) catalizează o reacție în care se încorporează o nouă moleculă de amoniac, acidul glutamic trecând în amida sa (glutamină). La rândul ei, glutamina poate trece din nou în glutamat cedând azotul amidic în diferite reacții de biosinteză.

3. Glutamat-sintaza (EC 1.4.1.13) se întâlneşte doar în țesuturile vegetale şi la microorganisme şi catalizează reacția:

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY



Printre altele, glutamina serveşte drept precursor în biosinteza bazelor azotate şi a ozaminelor. Un alt precursor în biosinteza bazelor azotate purinice este glicocolul care, în acelaşi timp, joacă şi rol de inhibitor alosteric pentru glutamin-sintetază azotul amidic al glutaminei mai poate fi cedat şi în căile de biosinteză ale glicocolului, serinei şi altor compuşi azotaţi. Toate acestea demonstrează faptul că glutamina stă la originea a numeroase căi de biosinteză a compuşilor azotaţi. Majoritatea acestor compuşi sunt inhibitori alosterici ai glutamin-sintetazei, efectul lor fiind cumulativ.

În cazul bacteriilor cultivate pe medii cu conţinut ridicat de azot amoniacal, peste 85% din azotul asimilat se încorporează datorită acţiunii glutamat-dehidrogenazei, în timp ce glutamin-sintetaza este responsabilă de fixarea unei cantităţi mici de azot datorită faptului că biosinteza sa este represată la nivelul transcripţiei genei corespunzătoare din ARN_m. Viteza biosintezei sale este diminuată şi datorită faptului că glutamin-sintetaza este modificată covalent prin adenilare. În medii sărace în azot amoniacal, biosinteza glutamin-sintetazei este accelerată. Aceasta înseamnă că reacţia catalizată de glutamin-sintetază este supusă unui control triplu:

- o reglare alosterică a activităţii enzimatice după principiul retroinhibiţiei;
- reglarea prin inducţie şi represie a biosintezei enzimei;
- reglarea prin modificări covalente datorate adenilării şi dezadenilării enzimei.

Adenilarea subunităţilor glutamin-sintetazei conduce la o inactivare parţială a enzimei (fig. 114).

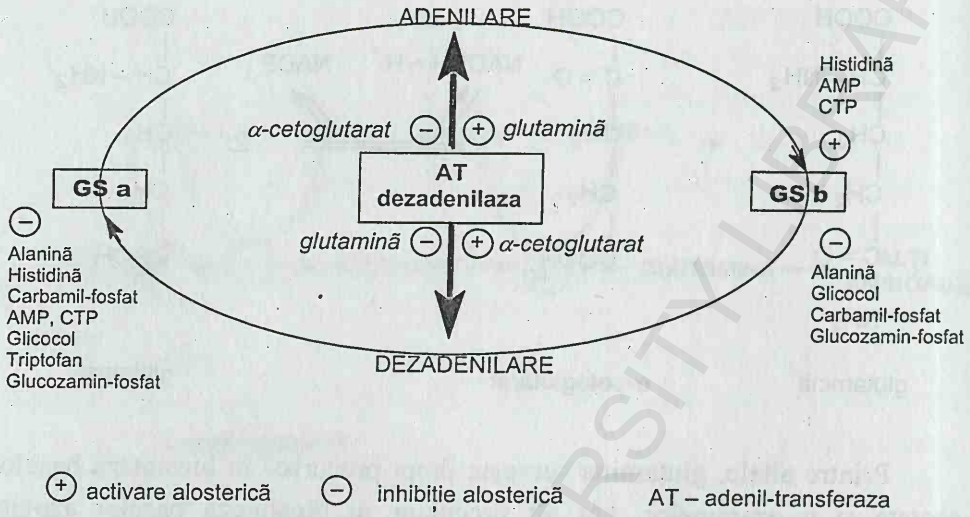


Fig. 114. Reprezentarea schematică a mecanismelor reglării activității glutamin-sintetazei (Pelmont, J. – 1995)

Enzima complet dezadenilată (GS b) prezintă o activitate remanentă de aproximativ 5% din activitatea enzimei native (GS a). Adenilarea are loc sub acțiunea adenil-transferazei (AT) şi se realizează prin fixarea radicalului AMP prin intermediul restului ortofosfat la nivelul grupei fenolice a unui rest de tirozină.

Aceeaşi enzimă (AT) catalizează şi reacția de dezadenilare a glutamin-sintetazei. Este vorba deci de două activități opuse realizate la nivelul a două situsuri catalitice distincte localizate în aceeaşi polipeptidă cu masa moleculară de aproximativ 110 kDa.

Dezadenilarea se poate face fie printr-o hidroliză ce pune în libertate AMP-ul, fie prin fosforoliză când se eliberează ADP. În funcție de semnalele exterioare pe care le primeşte, această enzimă multifuncțională poate acționa atât ca adenil-transferază cât şi invers, în sensul dezadenilării. Activitatea sistemului de adenilare – dezadenilare este modulată de raportul *glutamină /α-cetoglutarat*, precum şi prin mecanism alosteric.

Adenil-transferaza este asociată şi cu o a treia proteină notată convențional P II ce poate fi modificată ea însăşi prin ***uridilare*** şi ***dezuridilare*** (transfer de UMP). Dezadenilarea este favorizată în cazul asocierii *adeniltransferază + dezadenilază + P II-UMP*, iar adenilarea, care determină

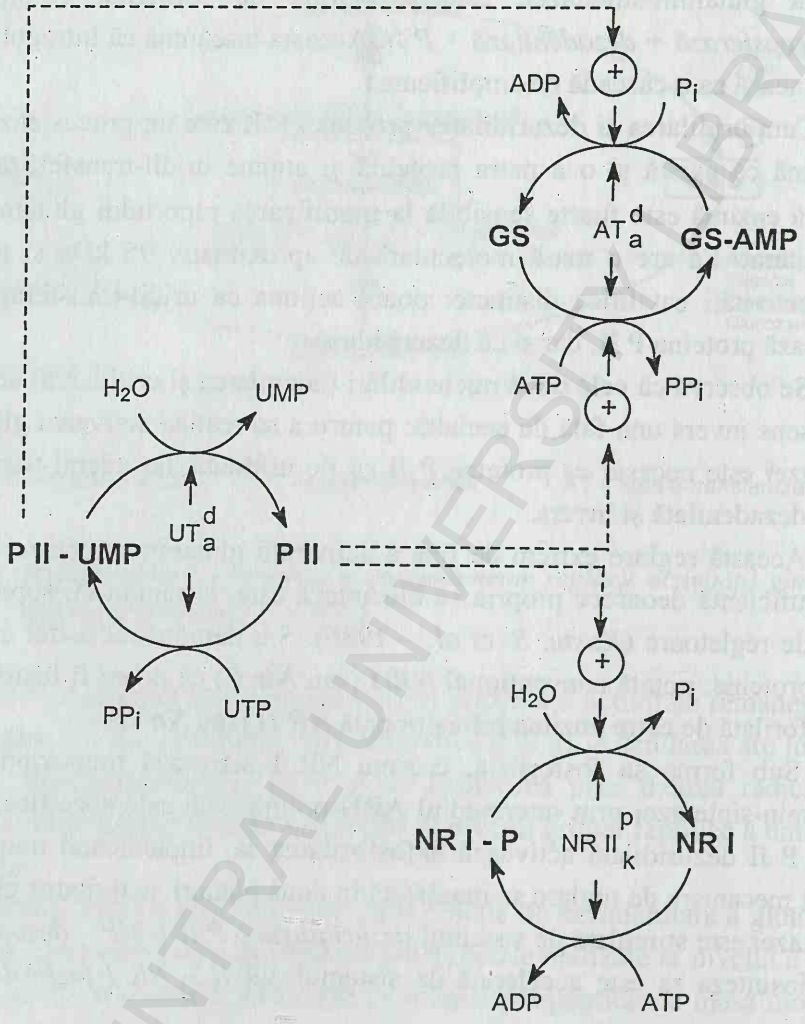
inhibiția glutamin-sintetazei, este favorizată de formarea complexului *adeniltransferază + dezadenilază + P II.* Aceasta înseamnă că întregul sistem funcționează ca o cascadă de amplificare.

Cum uridilarea şi dezuridilarea proteinei P II este un proces enzimatic, înseamnă că există şi o a patra proteină şi anume uridil-transferaza (UT). Această enzimă este foarte sensibilă la modificarea raportului glutamină /α-cetoglutarat. Ea are o masă moleculară de aproximativ 95 kDa şi prezintă două activități catalitice distincte: poate acționa ca uridil-transferază când uridilează proteina P II, dar şi ca dezuridilază.

Se observă că cele două nucleodilări (adenilarea şi uridilarea) acționează în sens invers una față de cealaltă: pentru a se realiza activarea glutamin-sintetazei este necesar ca proteina P II să fie uridilată, iar adenil-transferaza să fie dezadenilată şi invers.

Această reglare extrem de fină a activității glutamin-sintetazei nu este însă suficientă deoarece propria sa biosinteză este, la rândul ei, supusă unei cascade reglatoare (*Kustu, S. et al.* – 1986). S-a demonstrat astfel existența unei proteine, notată convențional ***NR I*** (sau ***Ntr C***) ce poate fi fosforilată şi defosforilată de către enzima bifuncțională ***NR II*** (sau ***Ntr B***).

Sub forma sa fosforilată, enzima NR I activează transcripția genei glutamin-sintetazei prin intermediul ARN-polimerazei sale specifice, iar enzima P II dezuridilată activează defosforilarea sa, împiedicând transcripția. Acest mecanism de reglare se manifestă în două planuri: activitatea glutamin-sintetazei este stimulată de sistemul *dezuridilază – P II-UMP – dezadenilază*, iar biosinteza sa este accelerată de sistemul *NR II – NR I fosforilată* (fig. 115).



AT^{d}_{a} adenil-transferaza glutamin-sintetazei (a - forma adenilată; b - forma dezadenilată)

$NR\ II^{p}_{k}$ activatorul transcriptiei (p - forma fosforilată; k - forma kinazică)

UT^{d}_{a} uridil-transferaza (a - forma adenilată; d - forma dezadenilată)

Fig. 115. Mecanismele reglării activității glutamin-sintetazei (Khes, S. G et al. – 1988)

BCU IAȘI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

d) Procarboxipeptidaza A. Ionii metalici pot îndeplini şi alte funcţii în celulă. De exemplu ei pot intra în alcătuirea unor precursori enzimatici inactivi participând direct la conversia acestora în enzimele active. De exemplu, procarboxipeptidaza A din pancreasul bovin conţine ioni de zinc şi are o masă moleculară de 96 kDa. Activarea zimogenului se realizează prin scindarea enzimatică a unor legături peptidice, iar ionul metalic se pare că îndeplineşte un rol dublu: pe de o parte el participă activ la procesul activării procarboxipeptidazei A, iar pe de altă parte participă la stabilizarea structurii cuaternare a enzimei active şi formarea configuraţiei spaţiale active a situsului catalitic, participând efectiv la realizarea actului catalitic.

Ionul de zinc este legat de trei resturi de aminoacizi, His_{69}, Glu_{72} şi respectiv Lys_{196}, la constituirea centrului activ mai participând resturile Arg_{145}, Tyr_{248} şi Glu_{270} (fig. 116).

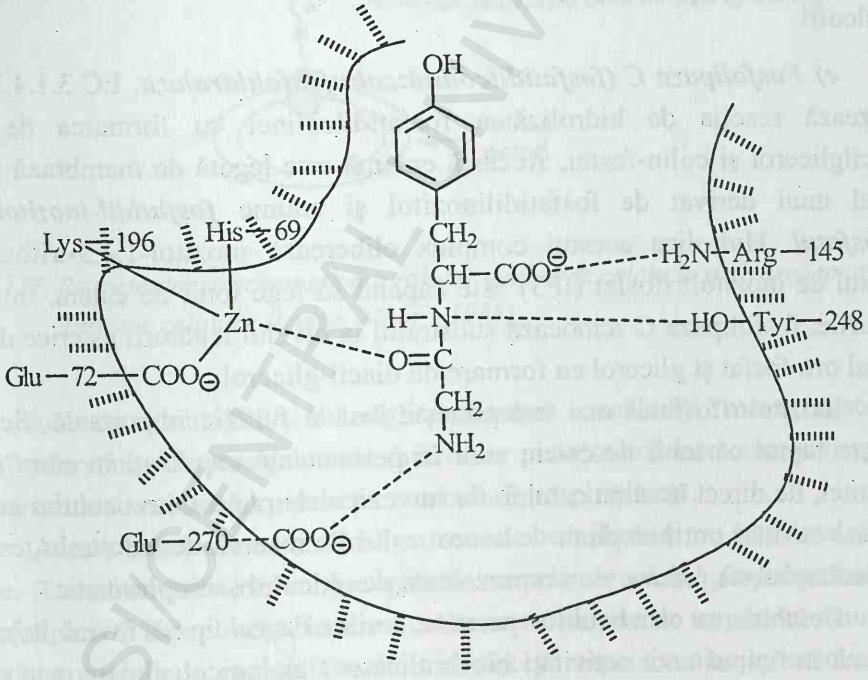


Fig. 116. Interacţiunea centrului activ al carboxipeptidazei A cu substratul sintetic glicil-tirozină

Deşi există atât în structura zimogenului cât şi a enzimei active, se pare că ionul metalic este legat mai puternic în molecula formei active comparativ cu precursorul inactiv. Carboxipeptidaza este o enzimă din clasa hidrolazelor cu acţiune dublă: peptidazică şi esterazică.

Utilizându-se dipeptida sintetică ***glicil-tirozina*** s-a demonstrat că gruparea C-terminală a acestui substrat se localizează într-o cavitate polară a moleculei de protein-enzimă prin dezlocuirea moleculelor de apă. În acelaşi timp, atomul de oxigen al grupării carbonilice din structura legăturii ce urmează a fi scindată devine ligand pentru zinc datorită electronilor săi neparticipanţi. Gruparea $-NH_2$ terminală a substratului interacţionază cu restul de acid glutamic din poziţia 270, de asemenea prin dislocuirea apei. Prin interacţiunea oxigenului carbonilic cu zincul, această grupare se polarizează determinând creşterea susceptibilităţii carbonului carbonilic la atacul nucleofil.

*e) **Fosfolipaza C (fosfatidilcolină:colinfosfohidrolaza**, EC 3.1.4.3)* catalizează reacţia de hidroliză a fosfatidilcolinei cu formarea de 1,2-diacilglicerol şi colin-fosfat. Această enzimă este legată de membrană la nivelul unui derivat de fosfatidilinozitol şi anume ***fosfatidil-inozitol-4,5-difosfatul***. Hidroliza acestui complex eliberează inozitol-1,4,5-trifosfatul. Restul de inozitoltrifosfat (IP3) este capabil să lege ionii de calciu. În toate cazurile, fosfolipaza C scindează substratul la nivelul legăturii esterice dintre restul ortofosfat şi glicerol cu formare de diacil-glicerol.

Inozitoltrifosfatul mai îndeplineşte însă o funcţie importantă. Se cunoaşte faptul că ionii de calciu sunt în permanenţă expulzaţi în afara citoplasmei, fie direct în afara celulei, fie în veziculele plate ale reticulului neted. Aceste cavităţi pot îndeplini, de aceea, rolul de rezervă de calciu. În ţesutul muscular, aceste rezerve sunt reprezentate de reticulul sarcoplasmatic.

Deschiderea canaliculilor permite ionilor de calciu să revină în citoplasmă în timpul unor activităţi biochimice şi fiziologice celulare cum ar fi contracţia musculară. După îndeplinirea funcţiei sale, calciul poate fi recuperat de ***calmodulină***. Legând ionii de calciu, aceasta poate activa alte proteine, în principal ***kinazele***. La baza acestui mecanism stă capacitatea inozitoltrifosfatului de a regla deschiderea canaliculilor şi, implicit, migrarea ionilor de calciu în citoplasmă.

Irvine şi *Moor* (1986) sugerează faptul că ionii de calciu pot activa şi o kinază care fosforilează inozitoltrifosfatul cu formare de inozitol-1,3,4,5-tetrafosfat (IP4) (fig. 117).

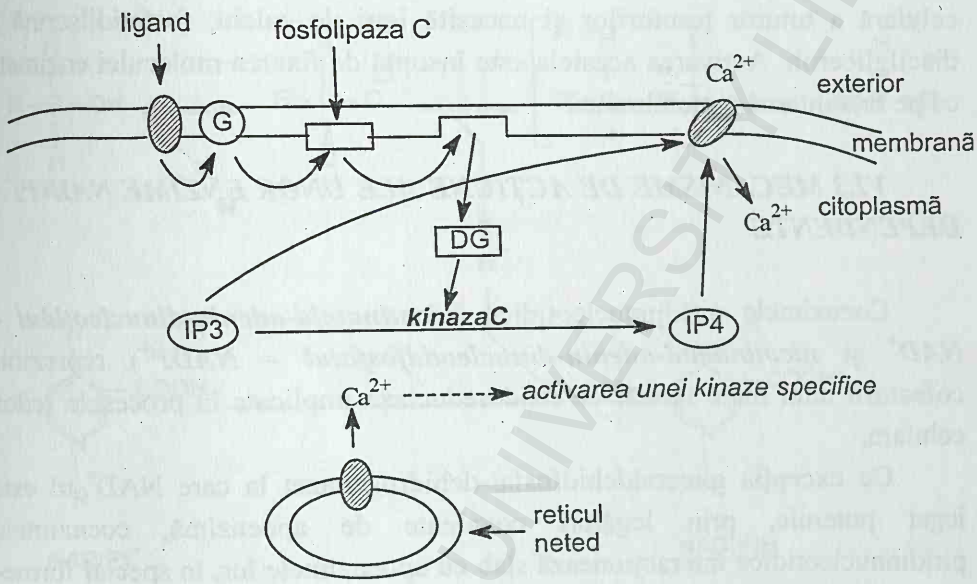


Fig. 117. Reprezentarea schematică a rolului ionilor de calciu în activarea unor procese celulare (Irvine, Moor - 1986)

Ionii de calciu, IP3 şi diacilglicerolii sunt consideraţi "mesageri secundari" intervenind în mecanismele diferitelor procese celulare cum ar fi secreţia, diviziunea celulară, contracţia musculară, respiraţia etc.

Aceste mecanisme sunt însă extrem de complexe şi nu sunt total elucidate. Transformările ce au loc poartă numele de ***ciclul fosfoinozitolilor.*** Fosfolipaza C îndeplineşte în acest ciclu un rol extrem de important deoarece produce agenţii de reglare inozitoltrifosfat şi respectiv diacilglicerolii, declanşând o serie de efecte care diferă de la o celulă la alta şi de la un ţesut la altul.

De aceea se consideră că există mai multe tipuri de fosfolipază C. Astfel, creierul bovin conţine trei astfel de forme notate ***PLC-I, PLC-II*** şi **PLC-III** considerate izoenzime ale fosfolipazei C.

Diacilglicerolul eliberat în urma acțiunii fosfolipazei C activează, la rîndul său o ***protein-kinază AMP-independentă*** descoperită recent de *Nishizuka* şi *Kyoto*. Această kinază a primit numele de ***protein-kinaza C (ATP:protein-fosfotransferaza,*** EC 2.7.1.37), se întâlneşte în citoplasma celulară a tuturor țesuturilor şi necesită ioni de calciu, fosfatidilserină şi diacilgliceroli. Activarea acesteia este însoțită de fixarea moleculei enzimatice pe fața internă a membranei.

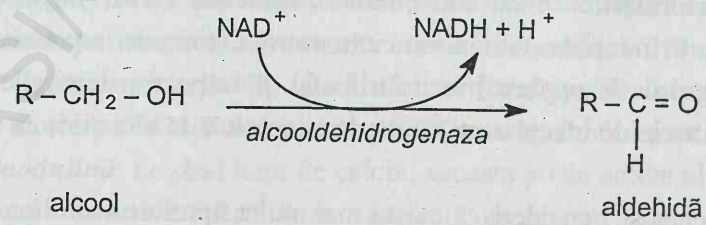
VI.3 MECANISME DE ACȚIUNE ALE UNOR ENZIME NAD(P)$^+$ – DEPENDENTE

Coenzimele piridinnucleotidice (***nicotinamid-adenin-dinucleotidul – NAD$^+$*** şi ***nicotinamid-adenin-dinucleotidfosfatul – NADP$^+$***) reprezintă cofactorii unui mare număr de oxidoreductaze implicate în procesele redox celulare.

Cu excepția gliceraldehidfosfat-dehidrogenazei la care NAD$^+$-ul este legat puternic, prin legături covalente de apoenzimă, coenzimele piridinnucleotidice interacționează slab cu apoenzimele lor, în special formele oxidate.

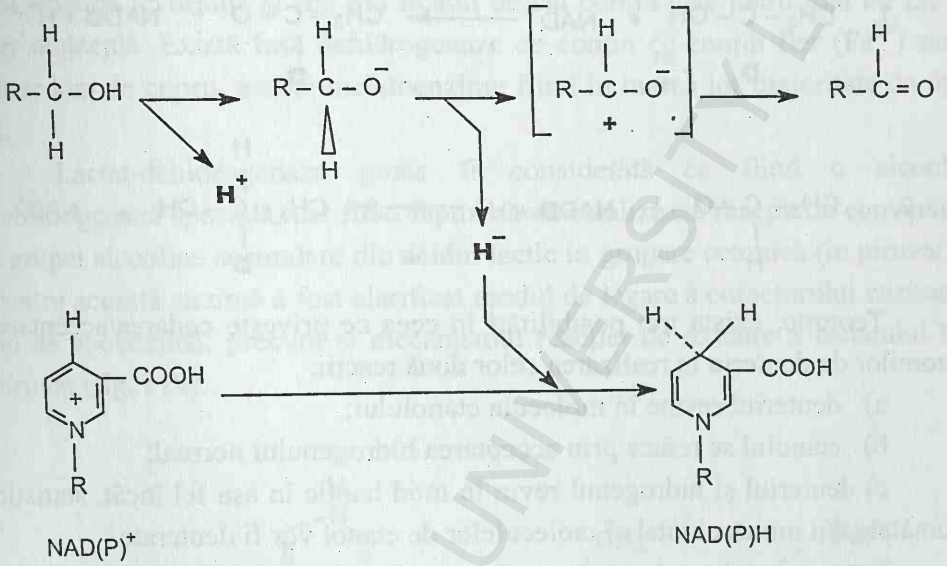
Cele două coenzime piridinice sunt implicate în peste 300 de reacții de oxidoreducere enzimatică. S-a constatat că NAD$^+$– ul poate trece în NADP$^+$ în urma acțiunii unei kinaze specifice, în prezență de ATP în calitate de donor de radicali fosfat şi, de asemenea, poate juca rol de donor de AMP în diferite reacții de poliadenilare (vezi cap. III.5.3.).

Pentru studiul mecanismului de acțiune al enzimelor NAD(P)$^+$- dependente s-a luat ca model alcooldehidrogenaza (EC 1.1.1.1) ce catalizează reacția generală:



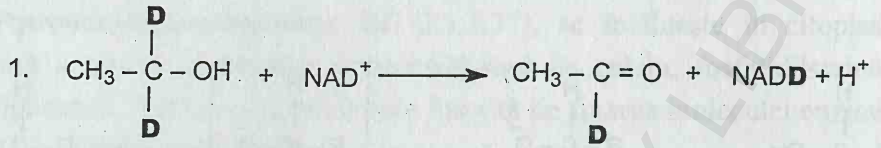
Reducerea NAD$^+$- ului constă în transferul a doi electroni şi a unui atom de hidrogen sub forma ionului hidrură (H^-). În toate reacțiile de oxido-

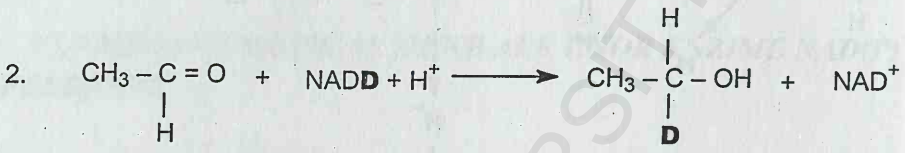
reducere, fără nici o excepție, catalizate de enzimele NAD(P)$^+$- dependente are loc transferul a doi electroni. Mecanismul cedării celor doi atomi de hidrogen din molecula substratului poate fi reprezentat astfel:



Formele reduse ale acestor cofactori (NADH şi respectiv NADPH) pot fi dozate cu uşurință datorită absorbției lor caracteristice la 340 nm (ε_{340} = 6220 $M^{-1} \cdot cm^{-1}$ la pH = 7,0). Gruparea amidică şi atomii de hidrogen se situează în acelaşi plan al nucleului piridinic din forma oxidată a cofactorilor. După reducere, atomul de carbon C_4 al heterociclului devine tetraedric. Noul atom de hidrogen, care a fost acceptat sub forma ionului H^- se localizează de o parte sau de cealaltă a planului heterociclului (*Foster, J. W. et al.* – 1980). Reacția este însă stereospecifică astfel încât, în cazul unor dehidrogenaze, acest atom de hidrogen se localizează numai de o parte a planului pe care o notăm convențional cu A, iar în cazul altor dehidrogenaze se localizează numai de cealaltă parte (B). Acest mecanism a fost demonstrat prin utilizarea în calitate de substrat a etanolului marcat radioactiv (etanol deuterat). Sub acțiunea alcooldehidrogenazei, NAD$^+$- ul se reduce acceptând un atom de deuteriu (NAD**D** în loc de NADH), celălalt atom de deuteriu legându-se de carbonul carbonilic al produsului de reacție. În reacția inversă, când substratul este

acetaldehida normală, iar cofactorul redus este forma deuterată (NAD**D**), atomul de deuteriu din NAD**D** va fi cedat carbonului metilenic:





Teoretic, există trei posibilități în ceea ce privește cedarea/acceptarea atomilor de deuteriu în realizarea celor două reacții:

a) deuteriul revine în molecula etanolului;

b) etanolul se reface prin acceptarea hidrogenului normal;

c) deuteriul și hidrogenul revin în mod haotic în așa fel încât, statistic, jumătate din numărul total al moleculelor de etanol vor fi deuterate.

Experimental s-a demonstrat că mecanismul reacției în ansamblu (adică prin realizarea ambelor reacții ale procesului) decurge conform ipotezei (a). În urma realizării reacției (2), NAD**D** cedează total deuteriul, iar toate moleculele de etanol formate din acetaldehida normală sunt deuterate. Mai mult, enzima recunoaște cele două suprafețe ale planului heterociclului piridinic. Astfel, unele dehidrogenaze (cum ar fi alcooldehidrogenaza) fixează hidrogenul la suprafața A, iar altele au specificitate față de suprafața B. De aceea, atunci când se realizează reacția (1) cu ajutorul unei dehidrogenaze ce manifestă specificitate față de suprafața A, iar reacția (2) cu una ce manifestă specificitate față de suprafața B, coenzima redusă își păstrează deuteriul.

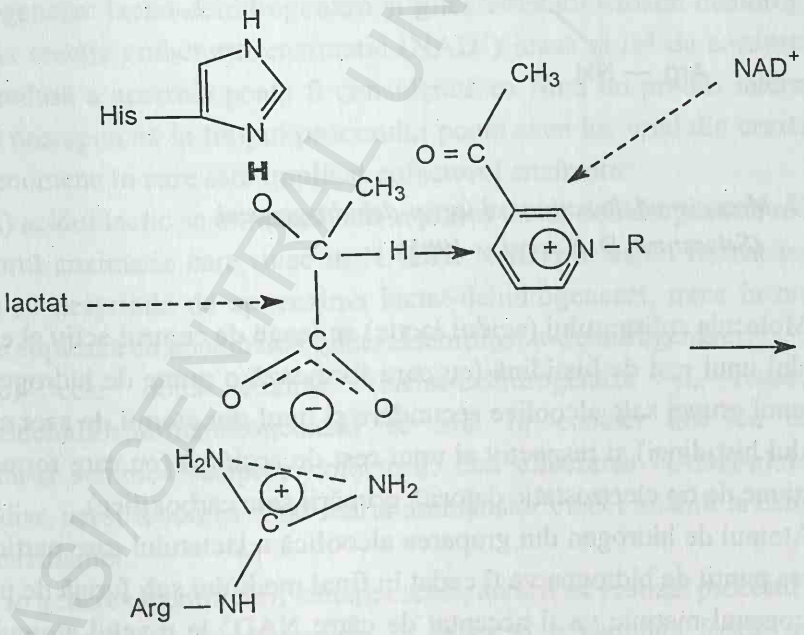
Alcoolul format prin reducerea acetaldehidei conține doi izotopi diferiți ai hidrogenului legați de același atom de carbon care poate fi astfel considerat ca fiind asimetric. O anumită dehidrogenază va sintetiza numai unul din cei doi antipozi optici, fapt ce explică stereospecificitatea acestor enzime. De aceea, dehidrogenazele $NAD(P)^+$- dependente pot fi clasificate în două grupe în funcție de acest criteriu:

– ***grupa A*** (***sau*** α): etanol-dehidrogenaza, izocitrat-dehidrogenaza, lactat-dehidrogenaza, malat-dehidrogenaza, glicerol-dehidrogenaza etc.;

– ***grupa B*** (***sau*** β): glicerolfosfat-dehidrogenaza, glucozo-6-fosfat-dehidrogenaza, glutamat-dehidrogenaza, homoserin-dehidrogenaza, unele alcool-dehidrogenaze specifice (cum ar fi cele din *Drosophylla sp.*) etc.

Unele alcool-dehidrogenaze conțin în moleculă ioni de zinc. De exemplu, enzima levuriană şi cea din ficatul de cal conțin câte patru ioni de Zn^{2+} per moleculă. Există însă dehidrogenaze ce conțin ce conțin fier (Fe^{2+}) sau chiar ioni de cupru, aceste metaloenzime fiind în marea lor majoritate de tip A.

Lactat-dehidrogenaza poate fi considerată ca fiind o alcool-dehidrogenază specială, dat fiind faptul că ea catalizează reacția de conversie a grupei alcoolice secundare din acidul lactic în grupare cetonică (în piruvat). Pentru această enzimă a fost clarificat modul de legare a cofactorului enzimatic de apoenzimă, precum şi mecanismul reacției de oxidare a lactatului în piruvat (fig. 118).



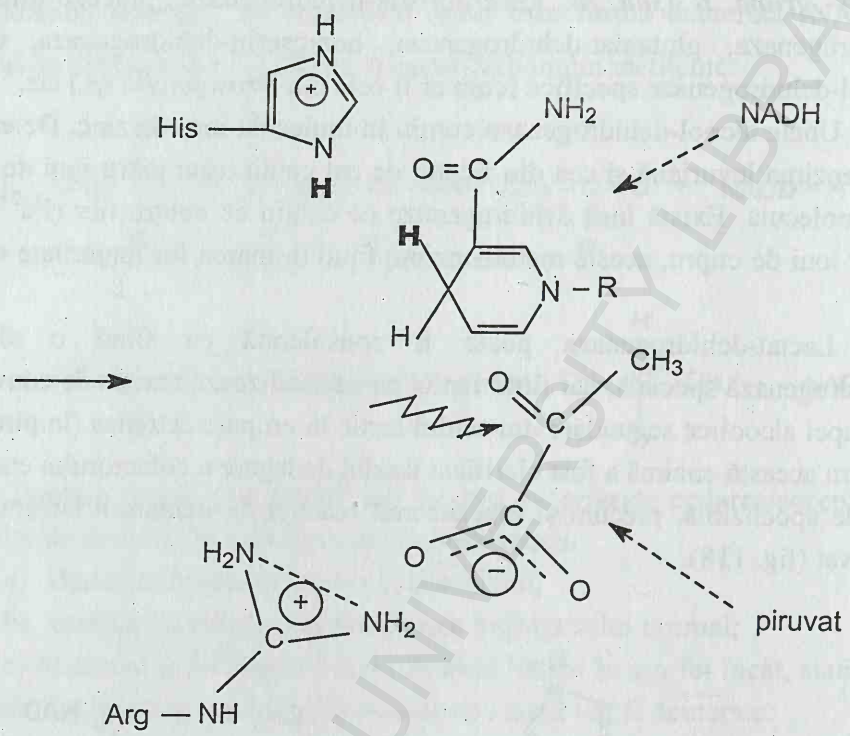


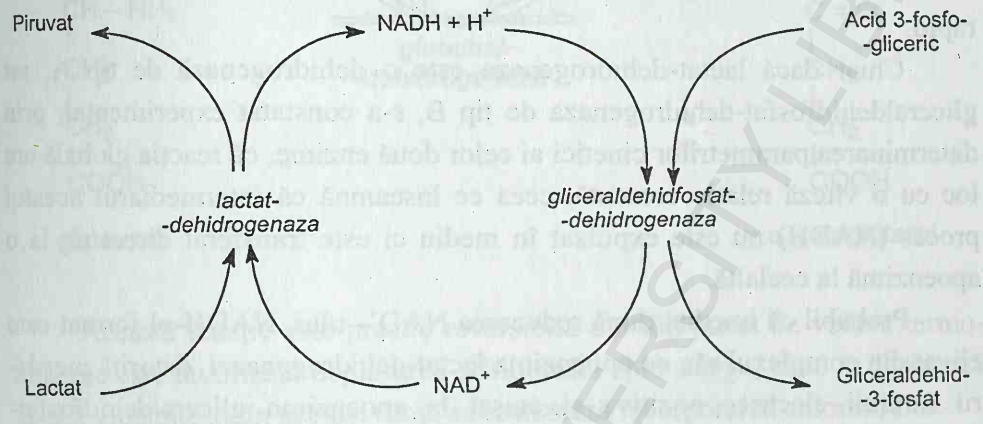
Fig. 118. Mecanismul de acțiune al lactat-dehidrogenazei (Srivastava, D. K. et al. – 1985)

Molecula substratului (acidul lactic) se leagă de centrul activ al enzimei la nivelul unui rest de histidină (cu care formează o punte de hidrogen între hidrogenul grupei sale alcoolice secundare și unul din atomii de azot ai heterociclului histidinei) și respectiv al unui rest de arginină (cu care formează o interacțiune de tip electrostatic datorită grupării sale carboxilice).

Atomul de hidrogen din gruparea alcoolică a lactatului care participă la formarea punții de hidrogen va fi cedat în final mediului sub formă de proton, iar hidrogenul metinic va fi acceptat de către NAD^+ la nivelul atomului de carbon C_4, coenzima trecând în forma redusă (NADH).

Multă vreme s-a pus problema dacă existența celor două categorii de dehidrogenaze (de tip A și B) reprezintă un hazard al procesului evolutiv sau dacă este într-adevăr utilă din punct de vedere biochimic și fiziologic. Au încercat să clarifice această dilemă *Srivastava, D. K. și colab.* care au plecat

de la reacția de reducere a piruvatului cuplată cu reacția de oxidare a aldehidei 3-fosfoglicerice:



Se observă că în aceste procese conjugate sunt implicate simultan două dehidrogenaze: lactat-dehidrogenaza şi gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza. În prima reacție cofactorul enzimatic (NAD^+) joacă şi rol de cosubstrat, iar forma redusă a acestuia poate fi considerată ca fiind un produs intermediar. Autorii presupun că în timpul procesului poate avea loc unul din următoarele două fenomene în care este implicat cofactorul enzimatic:

a) acidul lactic se oxidează sub acțiunea lactat-dehidrogenazei reducând cofactorul enzimatic care trece în NADH. NADH-ul astfel format în prima reacție se desprinde de apoenzima lactat-dehidrogenazei, trece în mediu şi apoi se cuplează cu apoenzima gliceraldehidfosfat-dehidrogenazei;

b) cele două enzime (lactat-dehidrogenaza şi, respectiv , gliceraldehidfosfat-dehidrogenaza) se află în contact una cu cealaltă, putându-şi schimba reciproc cofactorii, fără eliberarea NADH-ului ca intermediar, acest fenomen fiind foarte asemănător cu cel întâlnit la complecşii multienzimatici.

În vederea identificării situației reale, autorii au realizat procesul de mai sus utilizând lactat-dehidrogenaza în exces şi o cantitate foarte mică de NADH în aşa fel încât moleculele cofactorului să fie, în marea lor majoritate, legate de apoenzime.

De asemenea şi cea de a doua enzimă s-a adăugat în cantitate mică. În aceste condiții, cuplarea celor două reacții prin intermediul NADH-ului eliberat în mediu ar trebui să determine funcționarea foarte lentă a întregului sis-

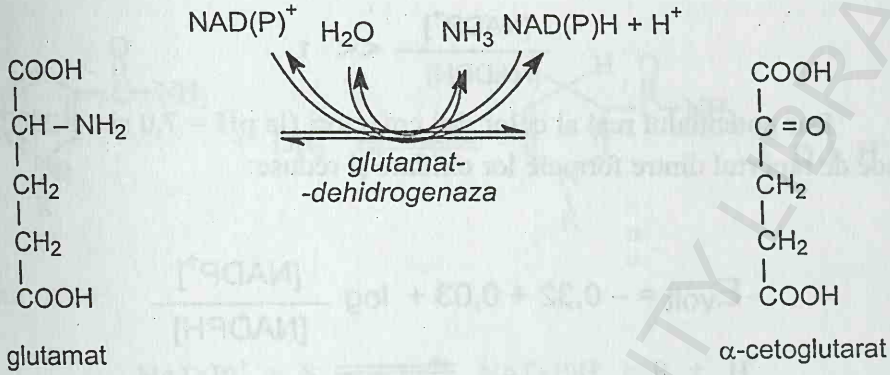
tem. În cealaltă situație, când cofactorul (sub forma sa redusă) este cedat de apoenzima primei enzime direct celei de a doua, fără a mai trece prin forma solubilizată în mediu, procesul în ansamblu ar trebui să funcționeze mult mai rapid.

Chiar dacă lactat-dehidrogenaza este o dehidrogenază de tip A, iar gliceraldehidfosfat-dehidrogenaza de tip B, s-a constatat experimental, prin determinarea parametrilor cinetici ai celor două enzime, că reacția globală are loc cu o viteză relativ crescută, ceea ce înseamnă că intermediarul acestui proces (NADH) nu este expulzat în mediu ci este transferat direct de la o apoenzimă la cealaltă.

Probabil că imediat după reducerea NAD^+- ului, NADH-ul format este clivat din complexul său cu apoenzima lactat-dehidrogenazei datorită pierderii sarcinii electrice pozitive şi ataşat la apoenzima gliceraldehidfosfat-dehidrogenazei. Ulterior, această presupunere a fost confirmată prin metoda cristalografică.

Mecanismele de acțiune ale enzimelor NAD^+- şi respectiv $NADP^+$- dependente sunt identice. Cum se explică atunci preferința unor apoenzime pentru NAD^+ şi a altora pentru $NADP^+$? Se pare că preferința situsului catalitic pentru unul sau pentru altul din cei doi cofactori este dictată de prezența în $NADP^+$ a radicalului fosfat suplimentar care posedă două sarcini electrice negative în plus față de NAD^+ şi care prezintă o mai mare afinitate față de apoenzimele acelor dehidrogenaze ce conțin în centrul lor activ un exces de sarcini electrice pozitive, deci un exces de aminoacizi bazici.

Cuplarea apoenzimelor cu NAD^+- ul sau cu $NADP^+$- ul este însă un proces mult mai complex ce depinde şi de alți factori. Pentru a ilustra acest lucru vom lua ca exemplu glutamat-dehidrogenaza, o enzimă importantă a metabolismului intermediar ce catalizează reacția reversibilă de dezaminare oxidativă a acidului glutamic:



Această reacție este practic reversibilă dar din punct de vedere termodinamic este favorizată deplasarea echilibrului spre stânga, când se formează acidul glutamic şi, în acelaşi timp, se realizează încorporarea amoniacului.

Există însă două glutamat-dehidrogenaze diferite din punctul de vedere al structurii lor chimice şi specificității de acțiune.

Una din ele catalizează numai reacția de dezaminare a glutamatului, conține NAD^+- ul în calitate de cofactor şi are molecula formată din patru subunități, iar cea de-a doua catalizează reacția inversă, de aminare reductivă a α-cetoglutaratului, fiind deci implicată în asimilarea azotului amoniacal. În general, ea conține NADPH-ul în calitate de cofactor deşi în unele țesuturi animale se întâlnesc şi glutamat-dehidrogenaze NADH-dependente.

Molecula sa conține şase subunități a căror structură diferă foarte mult de structura subunităților enzimei NAD^+- dependente. *Baker, P. J. şi colab.* presupun că evoluția acestor enzime s-a făcut lent, ele având aceeaşi origine ancestrală.

Potențialul standard al celor doi cofactori (NAD^+ şi $NADP^+$) este acelaşi (– 320 mV). Utilizarea NAD^+- ului în calitate de coenzimă se întâlneşte preponderent în secvențele metabolice oxidative din citoplasmă şi mitocondrii, în timp ce $NADP^+$- ul joacă un rol determinant în etapele reducătoare ale proceselor biosintetice, ceea ce poate fi reprezentat matematic astfel:

$$\frac{[NAD^+]}{[NADH]} >> 1$$

şi respectiv:

$$\frac{[NADP^+]}{[NADPH]} << 1$$

Dar potențialul real al celor doi cofactori (la pH = 7,0 şi t = 25°C) depinde de raportul dintre formele lor oxidate şi reduse:

$$E_{volt} = -0,32 + 0,03 + \log \frac{[NADP^+]}{[NADPH]}$$

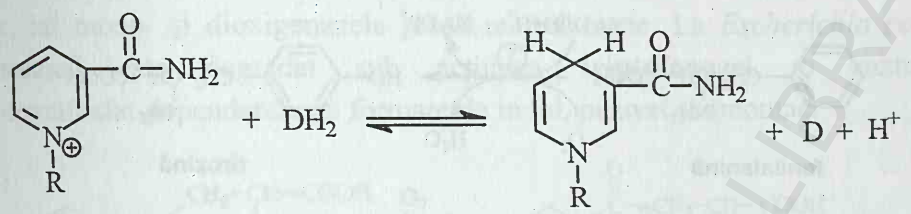
Aceasta înseamnă că NADPH-ul are o capacitate reducătoare mai mare, având un potențial de aproximativ – 400 mV, în timp ce potențialul caracteristic cuplului NAD^+/NADH este net inferior (– 190 mV). Acest raport este extrem de important de exemplu pentru reglarea ciclului Krebs la nivelul câtorva puncte şi în special la nivelul α-cetoglutarat-dehidrogenazei.

Celula trebuie însă să-şi regenereze continuu rezervele de NADPH necesare proceselor biosintetice, capacitatea reducătoare de NADPH-ului reprezentând un rezervor de energie comparabil cu cel al ATP-ului. Aceste două rezerve energetice sunt comunicante (adică interconvertibile), acest lucru fiind extrem de important pentru organismele autotrofe capabile să reducă CO_2 în ciclul Calvin.

Pentru fiecare mol de CO_2 asimilat sunt necesari trei moli de ATP şi doi moli de NADPH. Dar NADPH-ul nu este consumat numai pentru reducerea CO_2, el fiind necesar într-o multitudine de procese biosintetice. De exemplu, în hepatocite are loc un consum apreciabil de NADPH pentru biosinteza colesterolului precum şi pentru îndeplinirea funcțiilor sale biologice de către citocromul P-450. În principal, NADPH-ul se formează fie în diferite procese oxidative, fie prin conversia energiei din ATP sau alți compuşi macroergici.

Mecanismul de acțiune al coenzimelor piridinnucleotidice se bazează pe capacitatea nucleului piridinic al nicotinamidei de a se reduce reversibil (vezi III.5.3):

BCU IAŞI CENTRALA UNIVERSITARĂ LIBRARY



sau

$$NAD(P)^+ + S \rightleftharpoons NAD(P)H + P + H^+$$

Există numeroase enzime $NAD(P)^+$-dependente ce îndeplinesc reacții importante în oxidoreducerile celulare.

a) Oxigenazele aminoacizilor aromatici

Monooxigenazele, numite și ***hidroxilaze***, sau ***oxigenaze cu funcțiune mixtă*** catalizează reacțiile de hidroxilare ale unui mare număr de compuși aromatici sau chiar alifatici. În aceste reacții, NADH-ul și NADPH-ul reprezintă, cel mai adesea, sursa de electroni, fiind totodată reducătorul atomului de oxigen care nu este incorporat în produsul oxidat.

Fenilalanina este un aminoacid esențial, în timp ce tirozina ia naștere prin hidroxilarea acesteia sub acțiunea ***fenilalanin –4 - monooxigenazei (L – fenilalanină : tetrahidrobiopteridin – oxigen - oxidoreductaza,*** EC 1.14.16.1). Tirozina astfel formată poate fi metabolizată în continuare sub acțiunea mai multor oxigenaze (fig. 119).

Fenilalanina și tirozina pot fi metabolizate și pe calea acidului homogentizinic cu formarea unor intermediari importanți: acidul fumaric și acidul acetilacetic. În această secvență metabolică, conversia acidului homogentizinic are loc sub acțiunea unei dioxigenaze specifice.

În unele boli ereditare, caracterizate prin absența fenilalanin-hidroxilazei, este blocată calea metabolică de conversie a fenilalaninei în DOP-amină și în continuare în catecolamine, fiind accelerată calea acidului homogentizinic. În această situație se observă o creștere puternică a eliminărilor urinare de corpi cetonici, produși de degradare ai acidului homogentizinic, boala respectivă purtând numele de ***fenilcetonurie.***

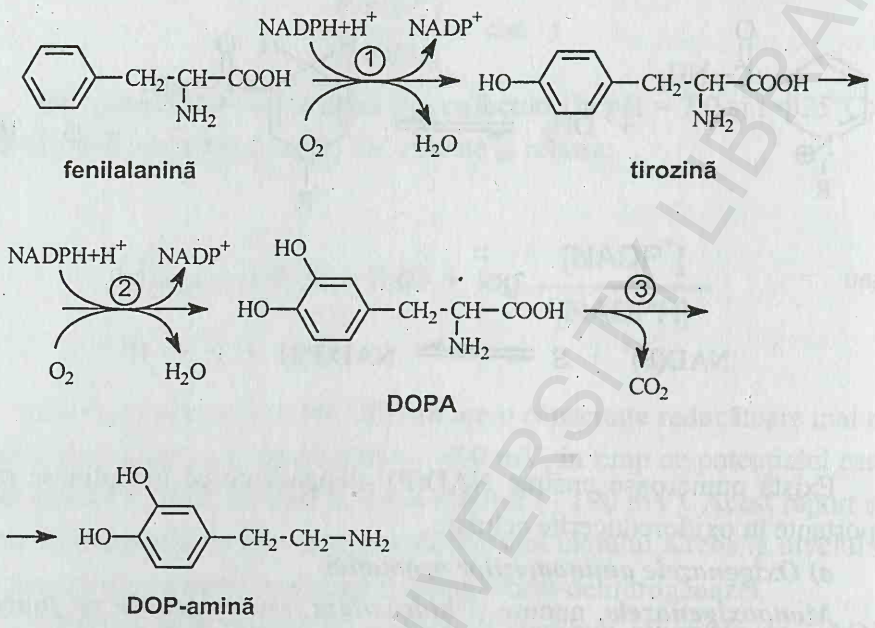
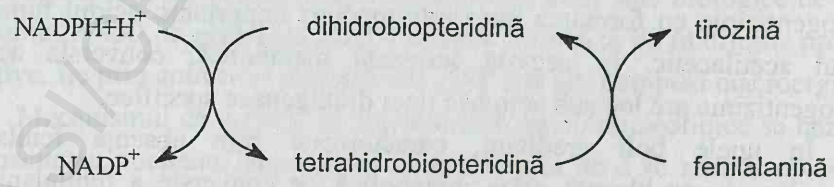


Fig. 119. Metabolismul fenilalaninei şi tirozinei sub acţiunea unor oxigenaze: ①-fenilalanin-hidroxilaza; ②-tirozinoxidaza sau tirozinaza; ③- DOPA-decarboxilaza

Fenilalanin-hidroxilaza este o oxidoreductază ce necesită o coenzimă specifică, ***dihidrobiopterina***, conversia fenilalaninei în tirozină fiind cuplată cu reacţia de conversie a tetrahidrobiopteridinei în dihidrobio-pteridină:



Şi în metabolismul triptofanului intervin oxigenaze piridinnucleotid-dependente (fig. 120). Astfel, prima etapă a degradării triptofanului pe calea kinureninei este catalizată de ***triptofanoxigenază (L-triptofan : oxigen-2,3-oxidoreductaza***, EC 1.13.11.11), când triptofanul este oxidat la formil-

kinurenină. Catabolismul triptofanului pe această cale este extrem de complex, iar mono- şi dioxigenazele joacă un rol cheie. La *Escherichia coli*, triptofanul este degradat sub acţiunea **triptofanazei**, o enzimă piridoxalfosfat-dependentă, cu formare de indol, piruvat şi amoniac.

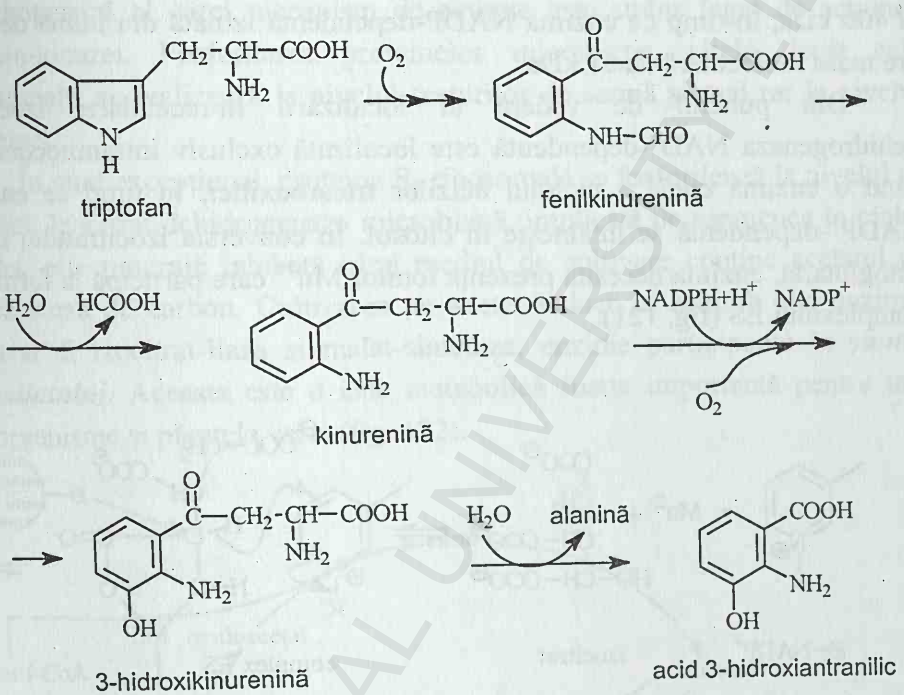
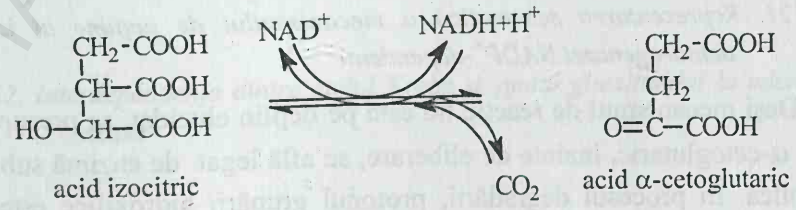


Fig. 120. Metabolismul triptofanului pe calea kinureninei

b) Dehidrogenaze NAD(P)-dependente

Atât în metabolismul glucidelor cât şi al lipidelor şi proteinelor, au loc reacţii de oxidoreducere catalizate de dehidrogenaze specifice piridinnucleotid-dependente. O enzimă interesantă din această grupă este ***izocitrat-dehidrogenaza*** implicată în ciclul Krebs, enzimă ce catalizează oxidarea acidului izocitric cu formare de acid α-cetoglutaric:



În prezent se cunosc două izocitrat-dehidrogenaze: ***izocitrat:NAD$^+$-oxidoreductaza decarboxilantă*** (EC 1.1.1.41) şi, respectiv, ***izocitrat: NADP$^+$-oxidoreductaza decarboxilantă*** (EC 1.1.1.42). Enzima NAD$^+$-dependentă izolată din diferite surse are masa moleculară cuprinsă între 270 şi 400 kDa, în timp ce enzima NADP-dependentă izolată din inimă de porc are masa moleculară de 61 kDa.

Din punctul de vedere al localizării intracelulare, izocitrat-dehidrogenaza NAD$^+$-dependentă este localizată exclusiv intramitocondrial, fiind o enzimă cheie a ciclului acizilor tricarboxilici, în timp ce enzima NADP$^+$-dependentă se întâlneşte în citosol. În conversia izocitratului în α-cetoglutarat, enzima necesită prezenţa ionilor Mn^{2+} care participă la formarea complexului ES (fig. 121).

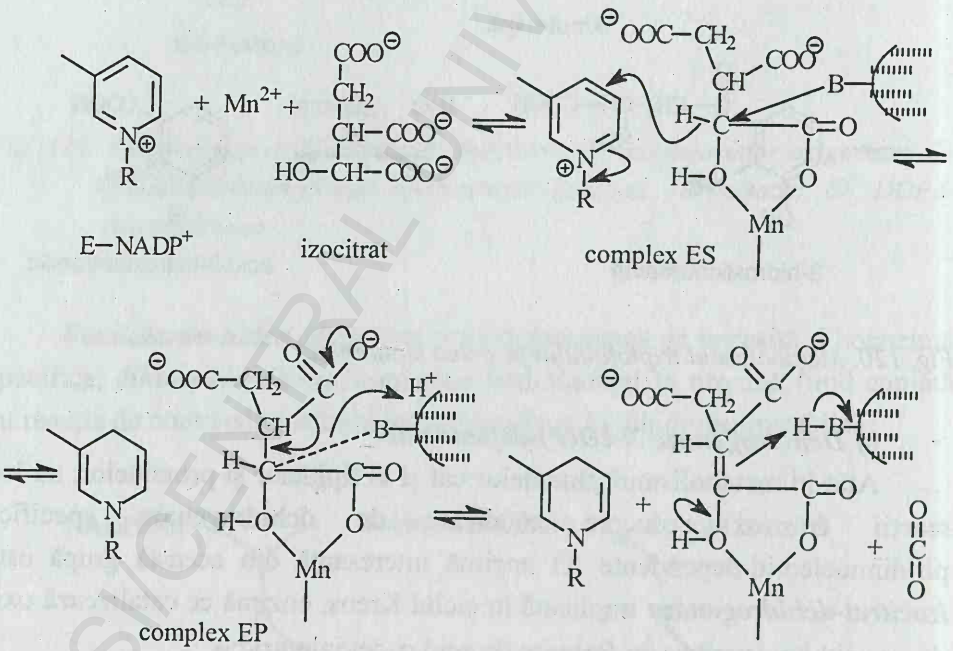


Fig. 121. Reprezentarea schematică a mecanismului de acţiune al izocitrat-dehidrogenazei NADP$^+$-dependente

Deşi mecanismul de reacţie nu este pe deplin elucidat, se presupune că acidul α-cetoglutaric, înainte de eliberare, se află legat de enzimă sub forma sa enolică. În procesul degradării, protonul grupării hidroxilice este cedat

unui catalizator bazic (B) care este o grupare polară din situsul catalitic. Celălalt atom de hidrogen este cedat nucleului piridinic al coenzimei, fixîndu-se la carbonul 4 al acestuia.

Garnak şi *Reeves* (1979) izolează din *Escherichia coli* o izocitrat-dehidrogenază al cărei mecanism de acţiune este strâns legat de acţiunea protein-kinazei. Fosforilarea proteinelor microbiene, altele decât cele ribozomale, se realizează la nivelul resturilor de serină şi mai rar la nivelul treoninei.

În mod excepţional, proteina S_1 ribosomală se fosforilează la nivelul tirozinei. Izocitrat-dehidrogenaza microbiană, implicată de asemenea în ciclul Krebs, este puternic inhibată când mediul de cultivare conţine acetatul ca unică sursă de carbon. Cultivarea pe acetat induce în schimb alte enzime, cum ar fi izocitrat-liaza şi malat-sintetaza, enzime participante în ***şuntul glioxilatului***. Aceasta este o cale metabolică foarte importantă pentru microorganisme şi plantele verzi (fig. 122).

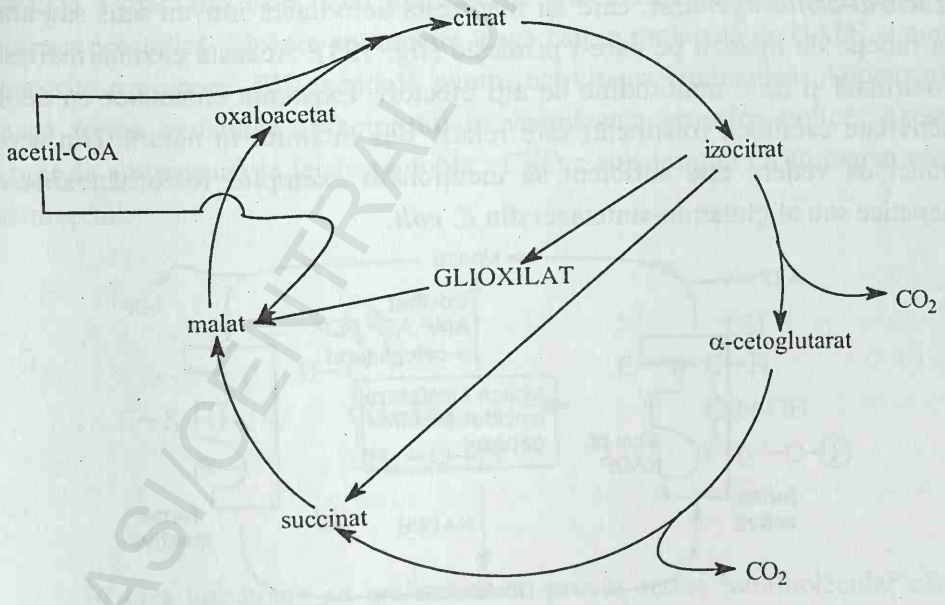


Fig. 122. Interdependenţa dintre ciclul Krebs şi şuntul glioxilatului la microorganisme

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Produsul reacției catalizate de izocitrat-dehidrogenază este α-cetoglutaratul format prin decarboxilarea izocitratului, enzima fiind inhibată în cazul cultivării microorganismului pe acetat. Izocitrat-liaza scindează acidul izocitric cu formare de succinat și glioxilat.

Deoarece acetatul constituie unica sursă de carbon, celula microbiană utilizează acest compus atât în procesele de biosinteză cât și în cele de degradare necesare obținerii de energie. Succinatul și mai ales oxalacetatul sunt precursori importanți ai biosintezei glucidelor. Ciclul Krebs nu poate fi însă complet suprimat de către șuntul glioxilatului deoarece α-cetoglutaratul reprezintă un precursor important pentru biosinteza glutamatului, prolinei, argininei etc. Izocitrat-dehidrogenaza bacteriană utilizează $NADP^+$-ul drept coenzimă. Când microorganismul se dezvoltă pe acetat, enzima este fosforilată la nivelul unui rest de serină aflat în situsul de legare a coenzimei. De aceea enzima este inactivată, în sensul că este împiedicată formarea complexului activ apoenzimă-coenzimă. Fosforilarea și defosforilarea enzimei este catalizată de o enzimă multifuncțională numită ***kinaza/fosfataza izocitrat-dehidrogenazei***, care își manifestă activitatea într-un sens sau altul în funcție de liganzii pe care-i primește (fig. 123). Această enzimă mai este controlată și de o multitudine de alți efectori. Existența enzimelor cu dublă activitate catalitică (distinctă) este relativ des întâlnită în natură. Din acest punct de vedere este suficient să menționăm exemplul fosfofructokinazei hepatice sau al glutamin-sintetazei din *E. coli*.

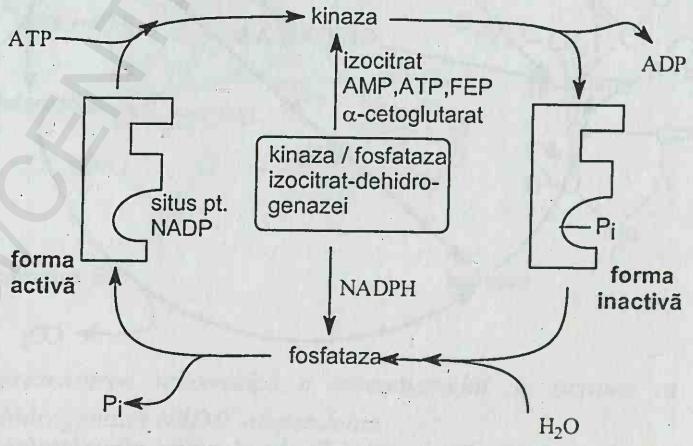
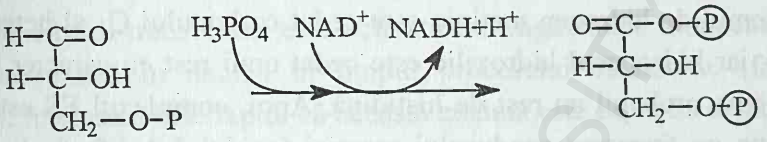


Fig. 123. Reglarea activității izocitrat-dehidrogenazei prin fosforilare / defosforilare

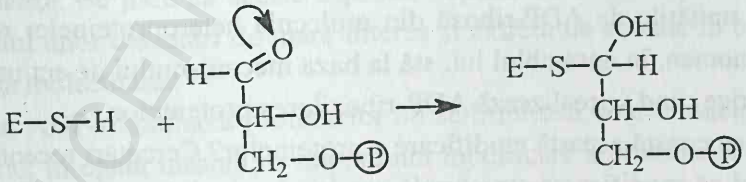
În metabolismul glucidelor se întâlneşte o altă dehidrogenază NAD-dependentă implicată atât în glicoliză cât şi în fermentaţia alcoolică. Este vorba de ***gliceraldehidfosfat-dehidrogenază (D-gliceraldehid-3-fosfat : NAD^+ - oxidoreductaza fosforilantă***, EC 1.2.1.12) ce catalizează conversia aldehidei 3-fosfoglicerice în acid 1,3-difosfogliceric:



gliceraldehid-3-fosfat

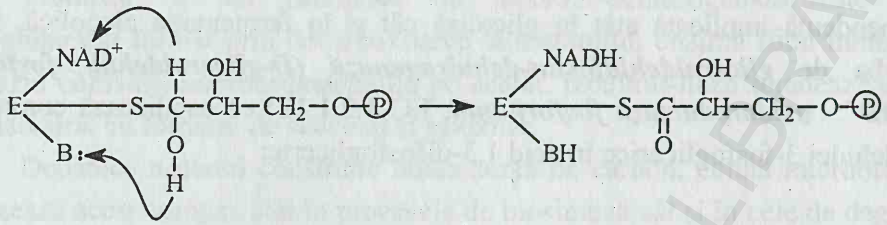
acid 1,3-difosfo-gliceric

Această enzimă a fost izolată din mai multe surse biologice constatându-se că toate preparatele obţinute au structuri similare. Molecula sa este un tetramer, fiind formată din subunităţi identice cu masa moleculară de 35 kDa. Cofactorul este legat puternic de apoenzimă comportându-se ca o grupare prostetică. Fiecare subunitate leagă câte o moleculă de NAD^+ şi conţine câte o grupare -SH esenţială pentru activitatea enzimatică. Apoenzima leagă forma oxidată a cofactorului în vecinătatea grupelor tiolice. Aceste grupe se adiţionează la legătura dublă >C=O a substratului cu formarea unui semiacetal:



În faza următoare se realizează un proces redox intramolecular când cofactorul este redus, iar tiosemiacetalul trece în tioester:

BCU IASI/CENTRU UNIVERSITAR



Atomul de hidrogen metinic este cedat carbonului C_4 al heterociclului piridinic, iar hidrogenul hidroxilic este cedat unui rest cu caracter bazic din situsul activ, probabil un rest de histidină. Apoi, complexul ES este scindat fosforolitic cu formarea produsului reacției (acidul 1,3-difosfogliceric), iar NADH se reoxidează, fără a se separa de apoenzimă, prin cedarea atomului de hidrogen unei molecule de NAD^+ din mediu.

Ca şi în alte cazuri, în etapele intermediare ale transformării, enzima apare sub forma sa acilată (E – S – CO – R), formă capabilă să interacționeze cu ortofosfatul.

c) ADP-ribozilarea proteinelor

NAD^+-ul nu este implicat doar în reacțiile de dehidrogenare ale diferitelor substrate. Astfel, nucleele celulelor de eucariote conțin enzima ***ADP-ribozil-transferaza*** ***(NAD^+:poliadenindifosfat-D-ribozil-acceptor-ADP-D-ribozil-transferaza***, EC 2.4.2.30) ce catalizează reacții de transfer a unuia sau mai multor resturi ADP-ribozil pe diferite molecule proteice, în special histone. Există şi o ***ADP-riboză-glicohidrolază*** ce catalizează reacția de depolimerizare a poli-ADP-ribozei, precum şi o ***ADP-ribozil-protein-liază*** ce clivează unitățile de ADP-riboză din molecula heteroproteinelor respective. Acest fenomen, în ansamblul lui, stă la baza mecanismului de acțiune al toxinei difterice când se realizează ADP-ribozilarea proteinelor.

În ce constă această modificare a proteinelor? Cercetări recente au relevat faptul că modificarea structurală are loc la nivelul unui rest de glutamat sau la nivelul unui rest de lizină, când acestea se află la capătul C-terminal al catenei polipeptidice. Coenzima oxidată (NAD^+) este scindată la nivelul legăturii N-glicozidice cu clivarea heterociclului piridinic. Restul de ribozo-5-fosfat este transferat la molecula de AMP de care se leagă prin restul său ortofosfat.

Prin legarea succesivă a unităților de ADP-riboză rezultă un polimer în care resturile de riboză se leagă între ele prin legături 1,2-glicozidice. Legătu-

ra β-N-glicozidică din molecula de NAD^+ are o energie similară cu cea din molecula de ADP (energia standard de hidroliză este de –34,4KJ/mol la pH=7,0 şi 25°C). De aceea, mecanismul de acţiune al NAD^+ în aceste reacţii este oarecum asemănător cu comportarea ATP-ului în reacţiile catalizate de către kinaze: el cedează fragmentul ADP-ribozil receptorului şi nu restul ortofosfat. Evident, utilizarea în acest scop a NAD-ului necesită permanenta sa regenerare.

ADP-ribozil-transferaza este activată de fragmentele monocatenare de ADN care există în nucleu în timpul procesului biosintetic (fragmente Okazaki). Interesant este faptul că această enzimă este capabilă de autocataliză. În acelaşi timp, ADP-ribozil-transferaza este inhibată de către ***3-aminobenzamidă***, un medicament cu acţiune antitumorală des utilizat în practica medicală. Acesta blochează ligaza specifică ce intervine în procesul normal de replicare a ADN-ului. Acest efect a fost observat în culturi cu celule de melanom uman.

Un alt aspect extrem de interesant este faptul că ligaza din colibacili, al cărei rol este de a „suda" fragmentele monocatenare de ADN, utilizează NAD^+-ul ca sursă de energie. Pe de altă parte, activarea transferazei este legată de unele modificări structurale ale cromatinei. În urma acestor modificări are loc o poli-ADP-ribozilare a histonelor, fapt ce diminuează interacţiunile acestora cu ADN-ul. În fine, această transferază este capabilă să moduleze *in vitro* o serie de protein-enzime implicate în metabolismul ADN-ului: ***ADN-ligaza II, ADN-polimerazele*** α şi β, ***topoizomerazele*** precum şi unele ***endonucleaze***. Se pare că aceste aspecte, departe de a fi complet elucidate, fac obiectul unor cercetări de mare interes şi extrem de actuale în biochimie şi biologia moleculară.

Dar, ADP-ribozilarea proteinelor nu se limitează doar la nucleu, ea reprezentând, în egală măsură, o importantă modificare a proteinelor citoplasmatice. Astfel, o transferază din citosol modifică factorul EF-2 al diftamidei pe care îl inactivează.

VI.4 MECANISME DE ACȚIUNE ALE UNOR FLAVOENZIME

Flavoenzimele, ca şi enzimele piridin-nucleotid-dependente sunt implicate în unele procese oxidoreducătoare ce au loc în organismele vii. Cofactorii flavinici, ***flavin-mononucleotidul (FMN)*** şi ***flavinadenin-dinucleotidul (FAD)*** sunt în general puternic legați de apoenzimele lor, jucând rol de grupări prostetice. Participarea flavoenzimelor în diferite procese redox este facilitată de capacitatea sistemului de două duble legături conjugate din nucleul izoaloxazinic de a da reacții de adiție 1,4 (vezi cap. III.5.4).

Termenul „flavină" face referire la culoarea galbenă (lat. *flavo* – galben) pe care o au acești compuși în starea lor oxidată. În urma reducerii nucleului izoaloxazinic, flavoproteinele capătă o culoare albă, ele putând fi uşor dozate spectrofotometric în domeniul vizibil prin diminuarea densității optice la 450 nm (absorbția molară la 450 nm pentru formele oxidate FMN şi FAD este de 11300 $M^{-1} \cdot cm^{-1}$, iar a formelor reduse $FMNH_2$ şi $FADH_2$ scade la valoare de 980 $M^{-1} \cdot cm^{-1}$). Potențialul redox al FMN şi FAD este de –219 mV la pH = 7,0 şi t = 30°C (fig. 124).

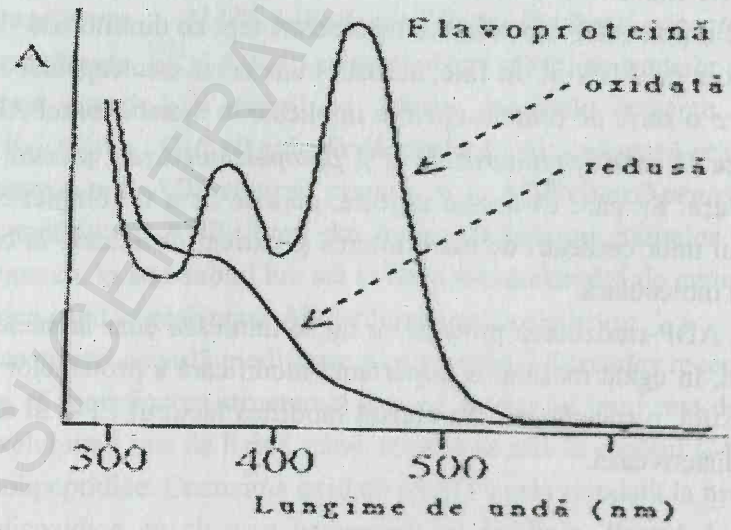
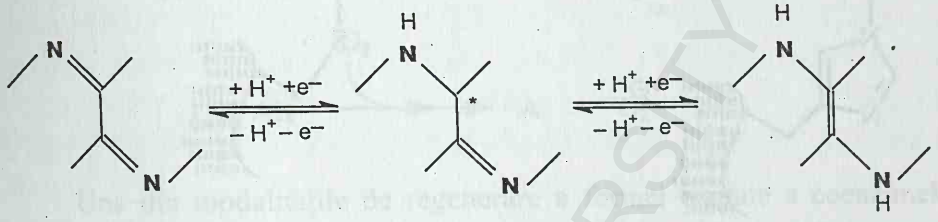


Fig. 124. Spectrul de absorbție caracteristic flavoproteinelor oxidate şi reduse (Pelmont, J. – 1995).

Valoarea potențialului redox se modifică însă profund în flavoproteine spre valori pozitive. În general, legarea cofactorilor flavinici de diferite apoenzime modifică complet toate proprietățile fizice ale acestora, flavoproteinele devenind donori, respectiv acceptori de electroni. Reacțiile redox ce au loc la nivelul nucleului izoaloxazinic pot fi reprezentate schematic astfel:



FMN FMNH* $FMNH_2$

FAD FADH* $FADH_2$

(forma semichinonică)

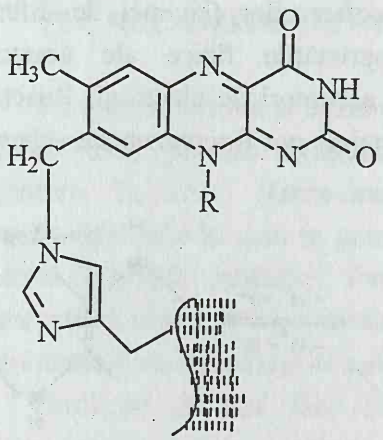
Cofactorii flavinici posedă în stare liberă o fluorescență puternică care însă dispare la flavoproteine datorită formării legăturilor covalente cu catenele polipeptidice ale apoenzimelor la nivelul anumitor resturi de aminoacizi (histidină, cisteină etc.).

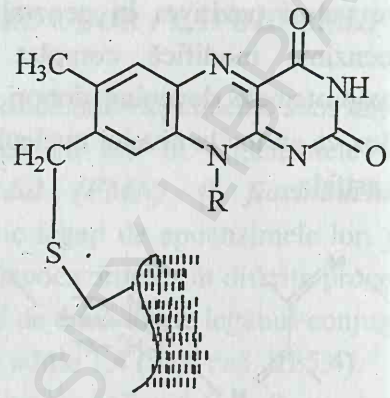
Principalele reacții catalizate de flavoenzime realizează dehidrogenarea aminoacizilor în prezența oxigenului, unele etape ale catenei respiratorii când flavoproteinele oxidează NADH-ul şi succinatul, dehidrogenarea unor substrate cu potențial redox scăzut cum ar fi feredoxina, acidul dihidrolipoic şi altele.

a) Dehidrogenazele flavinice

Dehidrogenazele FMN- şi FAD-dependente sunt implicate într-un mare număr de reacții de oxido-reducere enzimatică. Coenzimele flavinice sunt deseori legate covalent de apoenzimele lor; în aceste cazuri, separarea cofactorului nu poate fi realizată decât denaturând enzima. În general, cofactorii flavinici se leagă de apoenzimele lor fie la nivelul unui rest de histidină cum se întâmplă în cazul succinat-dehidrogenazei, fie la nivelul grupei sulfhidril a unui rest de cisteină ca în cazul monoamin-oxidazei:

BCU TRANSILVANIA UNIVERSITY LIBRARY





Dehidrogenazele flavinice acționează, în principal, asupra următoarelor tipuri de substrate:

- legături simple $-CH_2-CH_2-$ (de exemplu în succinat); produsul de reacție conține o legătură dublă în forma trans;

- oxidarea membranară a acidului lactic cu formare de piruvat sau oxidarea membranară a 3-fosfogliceratului şi a altor produşi intermediari de metabolism. În general, dehidrogenazele membranare se fixează de membranele respective prin intermediul cofactorului;

- oxidarea membranară a NADH-ului; complexul NADH-dehidrogenazic din mitocondrii, care conține FMN, fier şi sulf, transferă electronii unei chinone respiratorii (ubichinone);

- activitatea reductazică a flavoproteinelor întâlnită, mai ales, la reducerea unui citocrom sau a unei Fe-S-proteine. Unele reductaze conțin NADH, NADPH sau glutationul redus ca sursă de electroni. Mecanismele de acțiune în aceste situații sunt foarte complexe şi depind de natura donorului şi acceptorului de electroni;

- activitatea oxidazică a flavoproteinelor; aceste oxidaze sunt de fapt dehidrogenaze ce utilizează oxigenul molecular în calitate de acceptor de electroni. Aceste enzime sunt implicate în oxidarea aminoacizilor, aminelor, glucozei etc. Notând cu AH_2 substratul, reacția catalizată de o oxidază se poate reprezenta schematic astfel:

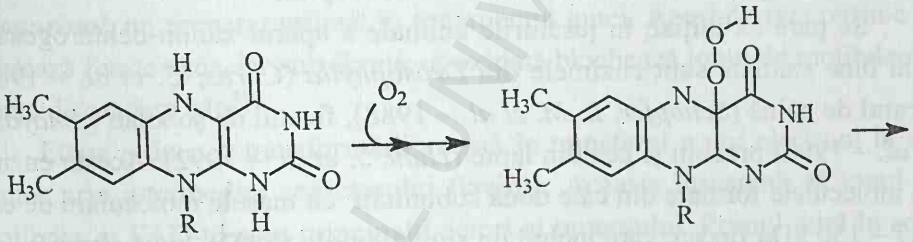
$$AH_2 \xrightarrow{O_2} A + H_2O_2$$

sau :

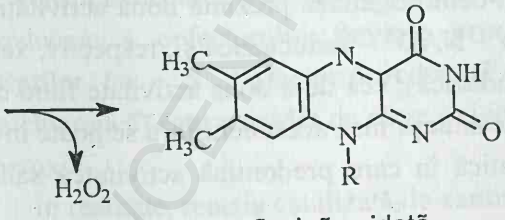
$$AH_2 \xrightarrow{O_2} AH^{\bullet} + O_2^{\ominus}$$

$$AH^{\bullet} \xrightarrow{O_2} A + O_2^{\ominus}$$

Una din modalitățile de regenerare a formei oxidate a coenzimelor flavinice constă în oxidarea acestora cu oxigen molecular, cu formarea, în calitate de intermediar, a unui peroxid la nivelul nucleului izoaloxazinic:



flavină redusă



flavină oxidată

Este esențial să nu se facă confuzie între ***oxidaze*** și ***oxigenaze*** acestea din urmă fiind enzime cu un mecanism de reacție complet diferit.

Cele mai importante dehidrogenaze flavinice sunt ***NADH-dehidrogenaza*** și ***succinat-dehidrogenaza*** implicate în lanțul respirator, ***dihidrolipoat-dehidrogenaza*** care este o componentă a complecșilor multienzimatici participanți la decarboxilarea oxidativă a α-cetoacizilor, ***acil-***

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

CoA-dehidrogenazele implicate în metabolismul acizilor graşi, ***aminoacid-oxidazele, xantin-oxidaza, glicerol-3-fosfat-dehidrogenaza*** şi altele.

Xantin-oxidaza (EC 1.17.3.2) este o enzimă complexă ce nu poate funcţiona doar cu un singur cofactor enzimatic. Principala funcţie biochimică a xantin-oxidazei constă în implicarea sa în procesele de degradare a bazelor azotate purinice. Xantina este un produs intermediar al catabolismului adeninei şi guaninei ce trece în acid uric sub acţiunea xantin-oxidazei. aceeaşi enzimă catalizează însă şi transformarea hipoxantinei în xantină, precum şi oxidarea altor compuşi heterociclici azotaţi cum ar fi pteridinele şi pirimidinele. Această enzimă poate exista sub două forme ce diferă între ele în funcţie de acceptorul de electroni. Una dintre ele este de fapt ***xantin-dehidrogenaza*** (EC 1.17.1.4) care oxidează substratul, fiind la rândul său reoxidată de către NAD^+, iar cealaltă este xantin-oxidaza propriu-zisă care utilizează oxigenul molecular în calitate de acceptor.

Se pare că iniţial, în ţesuturile animale a apărut xantin-dehidrogenaza. Mai bine studiate sunt enzimele din *Drosophylla* (*Curtis, C. et al.* – 1989), ficatul de găină (*Schopfer, L. M. et al.* – 1988), ficatul de şobolan (*Amaya, Y. et al.* – 1990) precum şi cea din lapte (*Hunt, J. et al.* – 1992). Aceste enzime au moleculele formate din câte două subunităţi cu masele moleculare de câte 145 – 150 kDa fiecare care includ un situs flavinic (FAD), două situsuri Fe – S similare ca structură cu cele întâlnite la feredoxina din cloroplaste şi un rest de molibdopterină ce aparţine grupului de cofactori cu molibden. Datorită acestei structuri complexe, xantin-dehidrogenaza prezintă două activităţi catalitice diferite: o activitate xantin – NAD^+ – reductazică şi, respectiv, xantin – O_2 – reductazică (sau xantin-oxidazică), cea de-a doua activitate fiind mult mai mică faţă de prima. În anumite situaţii însă acest echilibru se poate inversa conducând la o formă enzimatică în care predomină activitatea xantin-oxidazică

Conversia ***xantin-dehidrogenază → xantin-oxidază*** este datorată unor modificări conformaţionale la nivelul situsului flavinic. Astfel, conversia poate avea loc însă în două moduri diferite. În primul caz, conversia formei dehidrogenazice în forma oxidazică se realizează datorită oxidării unor grupări tiolice şi este reversibilă, forma dehidrogenazică regenerându-se în urma acţiunii unui reducător. În cel de-al doilea caz, transformarea este ireversibilă datorită faptului că ea este cauzată de o scindare proteolitică. Astfel, pentru enzima din lapte, conversia în forma oxidazică se face prin acţiunea tripsinei.

Catena polipeptidică din care este alcătuită apoenzima conține 1319 resturi de aminoacizi. Tripsina scindează două legături peptidice realizate de lizină (*Lys* $_{183}$ și respectiv *Lys*$_{539}$) fără ca structura terțiară să fie afectată deoarece cele trei catene care se formează rămân legate prin punți disulfidice fără a se produce nici o alterare importantă a arhitecturii lor spațiale (*Amaya, Y. et al.* – 1990).

Xantin-oxidaza reprezintă un model ideal pentru studiul enzimelor ce conțin în moleculă mai mulți cofactori capabili să participe la reacții de oxido-reducere. Procesul catalizat de această enzimă cuprinde de fapt două componente diferite. În prima fază are loc oxidarea substratului cuplată cu reducerea enzimei (prin acceptarea a doi electroni), iar în etapa a doua se realizează reoxidarea enzimei (de către oxigen sau NAD^+). Rolul principal în prima etapă îl joacă ionul de molibden care își schimbă starea de oxidare ($Mo^{6+} \rightarrow Mo^{4+}$). La acest nivel, xantin-oxidaza este inhibată specific de către ***allopurinol***, un preparat utilizat în tratamentul gutei. Acest derivat purinic se oxidează foarte ușor, iar sub forma sa oxidată blochează ionul de molibden la starea de oxidare Mo^{4+}.

Etapa a doua a transformării constă în transferul a doi electroni la acceptor prin intermediul cofactorului flavinic. Aceasta înseamnă că ionul de molibden și FAD-ul sunt principalii actori ai procesului. Primul intră în acțiune la debutul transformării acceptând cei doi electroni, iar cel de-al doilea ocupă poziția finală, între ei fiind localizate două situsuri Fe – S. Prima etapă, care constă în cedarea a doi electroni de către substrat, poate fi considerată ca o reducere a cofactorului flavinic prin intermediul molibdenului și a situsurilor Fe – S. Cofactorul redus ($FADH_2$) sau parțial redus (forma semichinonică) este reoxidat de către oxigen cu formare de H_2O_2 sau radicali superoxid.

În realitate, reacția catalizată de xantin-oxidază este mult mai complexă. Acțiunea enzimei din lapte în prezența unui exces de substrat determină reducerea completă sau parțială a tuturor cofactorilor prin acceptarea a doi, patru sau șase electroni, fiecare situs Fe – S fiind redus prin acceptarea câte unui singur electron (fig. 125).

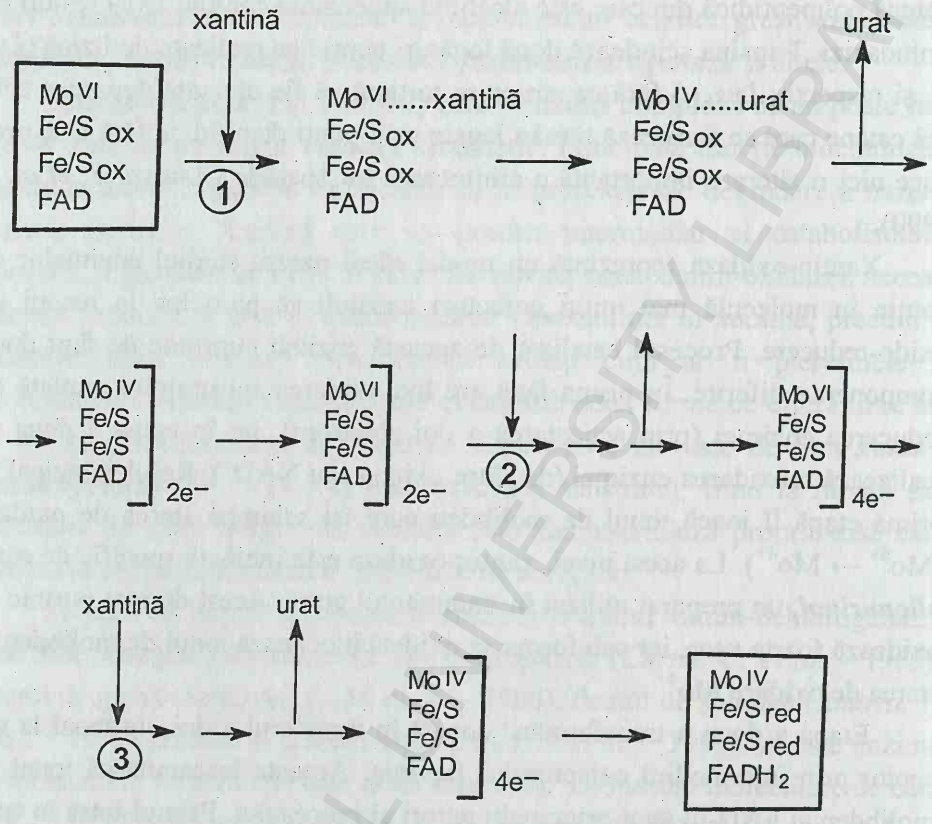
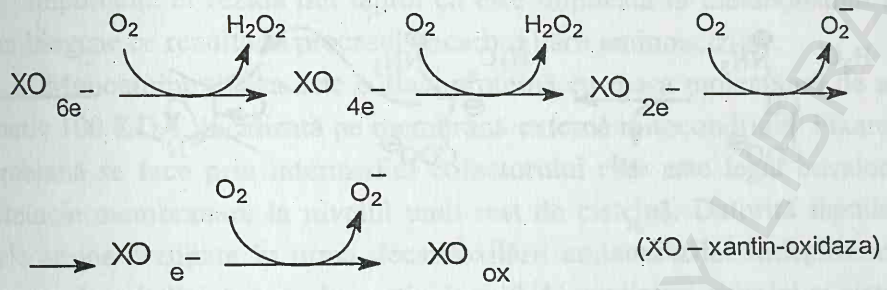


Fig. 125. Reducerea xantin-oxidaze în trei etape (Hille, R. et al. – 1995)

Reoxidarea enzimei reprezintă a doua componentă a procesului, ea având loc la nivelul cofactorului flavinic. Se consideră că există o repartiție globală a electronilor între situsurile Fe – S și FAD și că enzima este capabilă să cedeze electroni acceptorului înainte de a fi complet redusă. Cofactorul flavinic poate fi redus complet ($FADH_2$) sau parțial (FADH* – forma semichinonică). În primul caz el va ceda doi electroni NAD^+-ului (care trece în NADH) sau oxigenului (când se formează H_2O_2), iar în cel de-al doilea caz cedează un singur electron oxigenului (când se formează radicalul superoxid). Xantin-oxidaza poate produce deci fie H_2O_2, fie superoxid, în funcție de starea cinetică a sistemului:

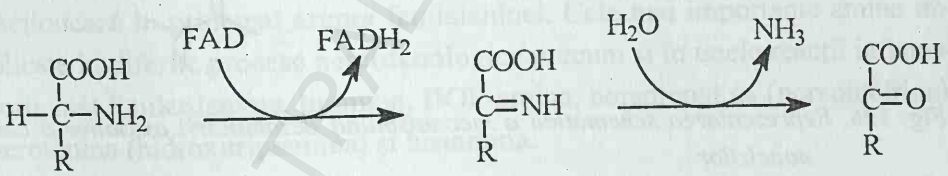
BCU CLUJ CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY



b) Oxidazele flavinice

Aceste flavoenzime sunt implicate în reacțiile de oxidare ale unui număr relativ mare de biomolecule, inclusiv a unor metaboliți intermediari. În ultimul timp sunt intens studiate oxidazele aminoacizilor din celulele animale. Aceste oxidaze prezintă o înaltă specificitate față de substratele lor, fiind cunoscute în special cele ce acționează asupra alaninei, valinei, norvalinei, norleucinei, acidului γ-aminobutiric, metioninei etc.

Cea mai cunoscută aminoacid-oxidază este cea extrasă din rinichiul de porc ce catalizează reacția:



D-aminoacid α-iminoacid α-cetoacid

În această reacție, care este o dezaminare oxidativă, nu este utilizat oxigenul molecular, ci atomul de oxigen din molecula apei. Prima etapă a reacției este o dehidrogenare a aminoacidului cu formarea unui α-iminoacid în calitate de produs intermediar.

Mecanismul de reacție are la bază formarea unei legături covalente efemere între substrat și cofactor, legătură pusă în evidență prin determinări spectrale în cinetică rapidă (fig. 126).

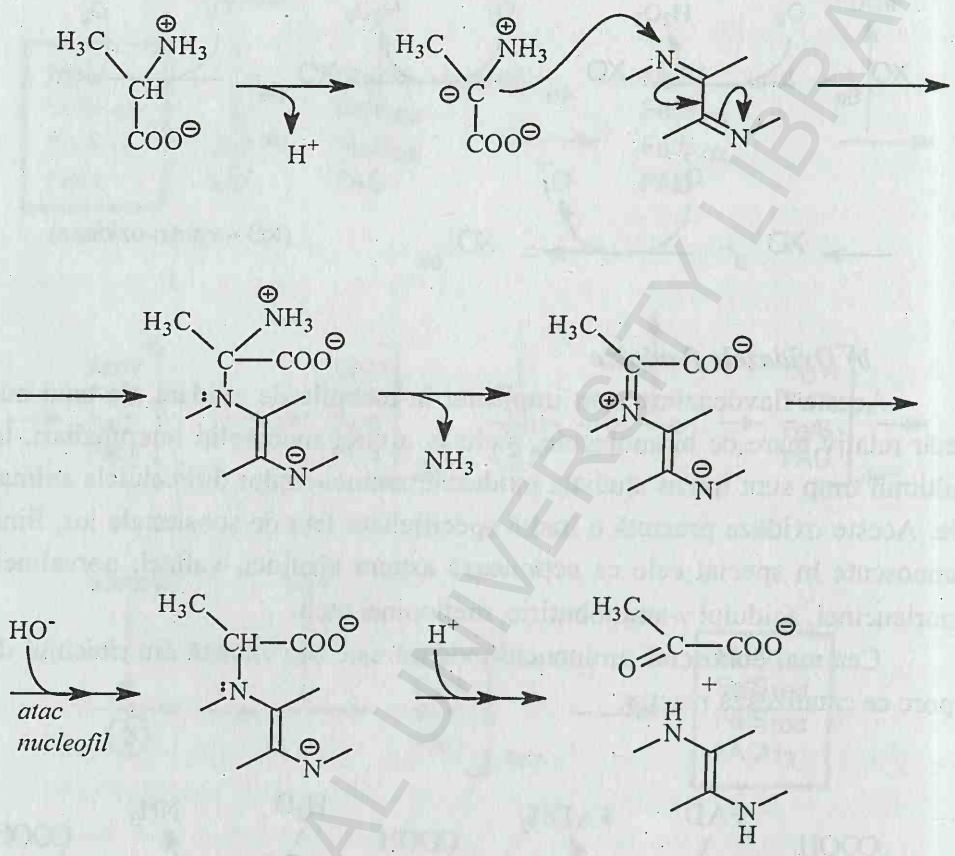


Fig. 126. Reprezentarea schematică a mecanismului dezaminării oxidative a aminoacizilor

Mecanismul de reacție reprezentat schematic în figura 126 nu cuprinde decât reducerea cofactorului flavinic de către substrat. Acceptorul final este oxigenul care va reoxida cofactorul prin intermediul unui complex flavină-oxigen.

O oxidază flavinică extrem de importantă este ***monoaminoxidaza (MAO)***, ce catalizează conversia aminelor în aldehidele corespunzătoare:

$$R{-}CH_2{-}NH_2 + O_2 + H_2O \xrightarrow[MAO]{} R{-}CHO + H_2O_2 + NH_3$$

BCU IAȘI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

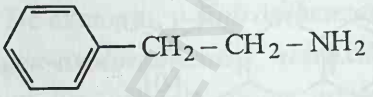
Importanța ei rezidă din faptul că este implicată în metabolismul aminelor biogene ce rezultă în procesul decarboxilării aminoacizilor.

Monoaminoxidaza este o flavoproteină cu masa moleculară de aproximativ 100 KDA, localizată pe membrana externă mitocondrială. Fixarea pe membrană se face prin intermediul cofactorului care este legat covalent de proteinele membranare la nivelul unui rest de cisteină. Datorită faptului că unele amine rezultate în urma decarboxilării aminoacizilor îndeplinesc importante funcții fiziologice, în particular rol de mediatori chimici ai sistemului nervos, monoaminoxidaza joacă un rol esențial în reînnoirea continuă a acestora. Din această cauză tratamentele aplicate în depresii nervoase se bazează pe inhibarea parțială a monoaminoxidazei, activitatea acesteia fiind de obicei crescută în aceste maladii.

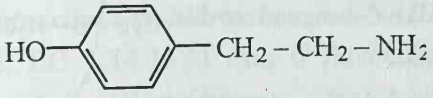
S-ar părea că există de fapt două enzime ce diferă în primul rând prin localizarea lor:

- ***monoaminoxidaza A*** (***MAO-A***), răspândită în diferite țesuturi, este activă în special în tubul digestiv și acționează în principal asupra serotoninei. Este inhibată selectiv de unele medicamente (*clorgyline*);

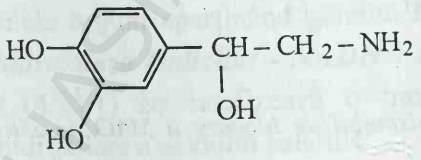
- ***monoaminoxidaza B*** (***MAO-B***) este localizată preponderent în creier, fiind de asemenea inhibată selectiv de medicamente specifice (*deprenyl*). Acționează în principal asupra fenilalaninei. Cele mai importante amine implicate în diferite procese neurofiziologice precum și în unele reacții inflamatorii sunt feniletilamina, tiramina, DOP-amina, noradrenalina (norepinefrina), serotonina (hidroxitriptamina) și histamina:



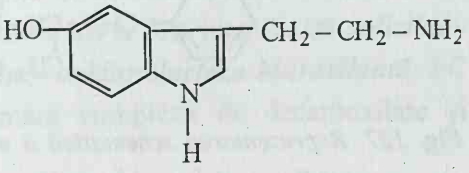
Fenil-etil-amina



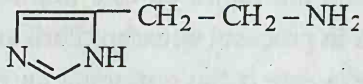
Tiramina



Noradrenalina
(norepinefrina)



Serotonina



Histamina

Prin prezența sa în tubul digestiv, MAO-A joacă un rol important de protecție a organismului față de aminele de origine alimentară. De exemplu tiramina, care este un puternic vasoconstrictor, este prezentă în cantități relativ crescute în produsele alimentare obținute prin fermentație cum ar fi brânzeturile. Aceste amine pot să apară în tractul digestiv şi în unele fermentații intestinale.

La baza tratamentelor antidepresive stă influența pe care o au medicamentele respective asupra monoaminoxidazei B (cerebrale) fără a provoca efecte secundare cauzate de proasta filtrare a aminelor alimentare. Inhibitorii selectivi dau efecte secundare, în special prin modificarea presiunii arteriale, a ritmului cardiac etc. Amfetaminele de exemplu, sunt inhibitori competitivi neselectivi, analogi structurali ai feniletilaminei (pentru MAO-B) şi respectiv ai serotoninei (pentru MAO-A).

Medicamentele ***Deprenyl*** şi ***Clorgyline*** sunt inhibitori ireversibili ai MAO datorită capacității de a forma legături covalente cu nucleul izoaloxazinic al cofactorului acestei enzime (fig. 127).

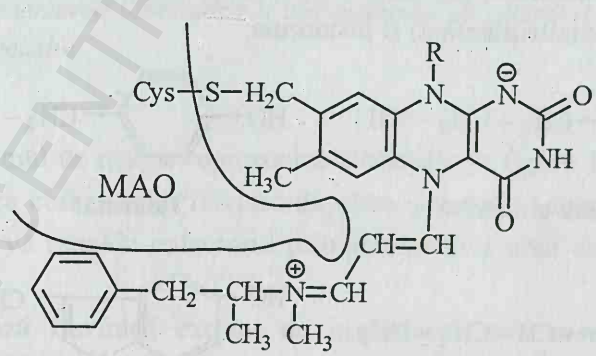
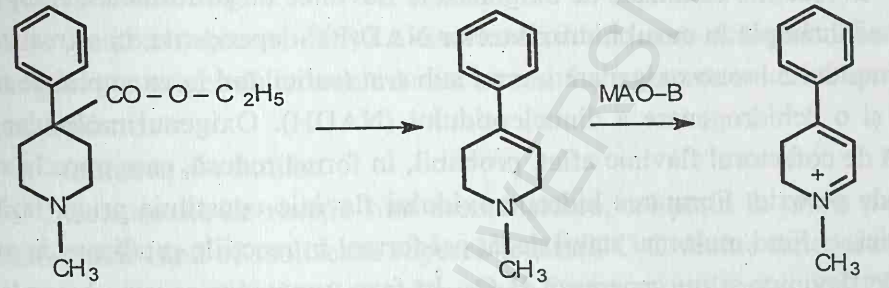


Fig. 127. Reprezentarea schematică a mecanismului de blocare a MAO de către medicamentele antidepresive

Studiul mecanismului de acțiune al acestor medicamente a fost îmbogățit cu totul întâmplător, în urma publicării unui articol de către *Singer* în

1987. Cu câțiva ani înainte, un student american a avut nefericita idee de a se droga cu un narcotic sintetizat de el însuşi - ***petidina***. Imediat au apărut simptome grave, similare cu cele din boala Parkinson. Acest accident a declanşat unele cercetări în mai multe laboratoare în speranța de a găsi un tratament mai eficient în boala Parkinson. Ulterior s-a demonstrat că drogul respectiv se transformă uşor în metil-fenil-tetrahidropiridină, în special la pH acid. Produsul format este un neurotoxic puternic ce acționează asupra monoaminoxidazei B trecând în metil-fenil-dihidropiridină:

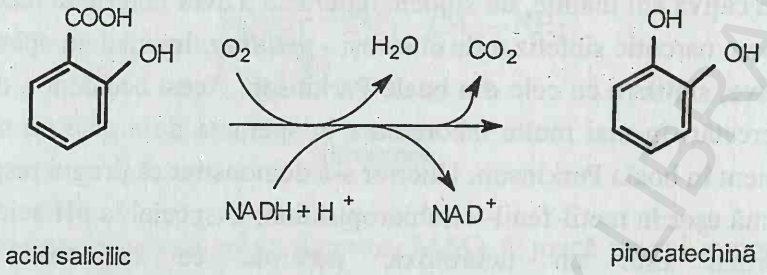


petidină (meperidină) | 1-metil-4-fenil--1,2,3,6-tetra-hidro-piridină | 1-metil-4-fenil--2,3-dihidro--piridină

c) Mono-oxigenazele flavinice

Oxigenazele (hidroxilazele) implicate în metabolismul aminoacizilor sunt enzime $NAD(P)^+$-dependente. Există însă şi oxigenaze flavinice ce catalizează diferite reacții de oxido-reducere celulară.

De exemplu, ***p-hidroxibenzoat-hidroxilaza (4-hidroxibenzoat-NADPH : oxigen-oxidoreductaza hidroxilantă***, EC 1.14.13.2) este o flavoenzimă prezentă în celulele unor microorganisme (*Pseudomonas, Azotobacter, Acinetobacter* etc.) ce catalizează oxidarea NADPH (uneori NADH) concomitent cu hidroxilarea nucleului benzoic al acidului p-hidroxibenzoic. La unele tulpini aparținând genului *Pseudomonas* a fost identificată ***salicilat - hidroxilaza (salicilat - NADH : oxigen - oxidoreductaza hidroxilantă***, EC 1.14.13.1) ce catalizează o transformare complexă de decarboxilare şi hidroxilare a acidului salicilic:



acid salicilic pirocatechină

În reacțiile catalizate de oxigenazele flavinice nu se formează H_2O_2 așa cum se întâmplă în cazul hidroxilazelor NAD(P)$^+$-dependente, ci se realizează simultan o mono-oxigenare a unui substrat (salicilatul în exemplul de mai sus) și o dehidrogenare a dinucleotidului (NADH). Oxigenul molecular se leagă de cofactorul flavinic aflat, probabil, în formă redusă, care trece în stadiul de peroxid. Formarea hidroperoxidului flavinic constituie prima fază a reacției, el fiind mult mai stabil decât cel format în reacțiile catalizate de oxidazele flavinice și nu generează H_2O_2. În faza următoare se rupe heterolitic legătura dintre cei doi atomi de oxigen ai hidroperoxidului. Unul din atomi împreună cu cei doi electroni ai legăturii formează molecula de apă. Celălalt atom de oxigen, prin cedarea electronului său de valență devine puternic oxidant, fixându-se pe molecula substratului.

În hepatocitele mamiferelor există o ***mono-oxigenază cu specificitate largă*** capabilă să oxideze o multitudine de substrate nucleofile și hidrofobe ce conțin atomi de azot, sulf, seleniu, iod etc. Mecanismul de acțiune al acestei enzime include aceeași etapă în care se formează hidroperoxidul flavinic stabil. Până la formarea acestui intermediar, mecanismul de acțiune este identic cu cel descris pentru hidroxilazele microbiene. Transformarea în continuare a hidroperoxidului flavinic poate urma o cale sau alta în funcție de natura substratului și respectiv constantele de viteză. Este interesant faptul că apoenzima ce înconjoară cofactorul flavinic poate influența efectele electronice din molecula acestuia, iar în unele cazuri poate chiar să reducă nucleul izoaloxazinic. În felul acesta, reactivitatea cofactorului poate fi puternic modificată.

BCU

VI.5 MECANISME DE ACȚIUNE ALE UNOR ENZIME TPP-DEPENDENTE

Tiamina (aneurina, vitamina B_1) îndeplineşte importante funcţii coenzimatice sub forma sa pirofosforilată (***tiaminopirofosfat - TPP***). Principalele reacţii catalizate de enzimele TPP-dependente sunt:

- decarboxilarea neoxidativă a α-cetoacizilor, în care enzimele necesită şi prezenţa ionilor Mg^{2+};
- decarboxilarea oxidativă a α-cetoacizilor în care acceptorul final de hidrogen este oxigenul, iar enzima mai necesită şi prezenţa acidului lipoic ca agent oxidant;
- formarea α-cetolilor.

Mecanismele de reacţie sunt asemănătoare, cel puţin în prima parte a transformării când se realizează ruperea legăturii C-C vecine funcţiei carbonil. Ruperea acestei legături se soldează cu formarea moleculei de CO_2 şi a unui carbanion legat de enzimă.

În fazele următoare, acest anion se poate transforma în mod diferit: a) dacă se leagă de un proton, produsul reacţiei este o aldehidă, acest mecanism de reacţie realizându-se în decarboxilarea neoxidativă a α-cetoacizilor; b) dacă acest anion reacţionează cu un agent oxidant rezultă un compus carboxilic (ca în decarboxilarea oxidativă a α-cetoacizilor); c) când anionul interacţionează cu un compus carbonilic, produsul reacţiei este un cetol.

În complexul multienzimatic al ***piruvat-dehidrogenazei (piruvat : lipoamid-2-oxidoreductaza***, EC 1.2.4.1) format din 3 enzime (piruvat-dehidrogenaza, dihidrolipoat-transacetilaza şi respectiv dihidrolipoat-dehidrogenaza) şi 5 coenzime (TPP, CoA-SH, acidul lipoic, NAD^+ şi FAD), tiaminpirofosfatul este mobil şi se comportă ca un co-substrat faţă de care enzima prezintă o mare afinitate (K_M=10 μM).

Prin heterociclul său pentaatomic, tiaminpirofosfatul realizează un atac nucleofil asupra piruvatului (fig. 128).

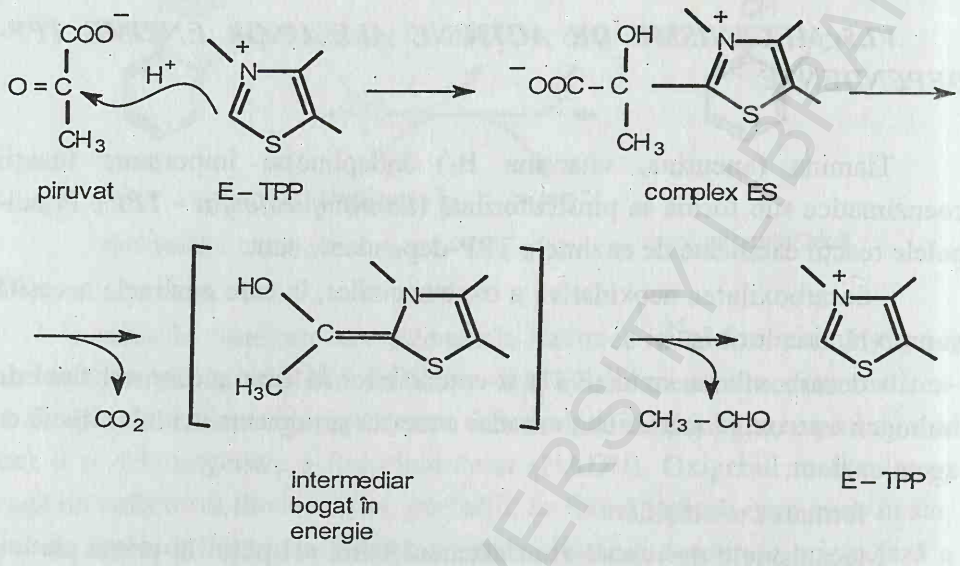
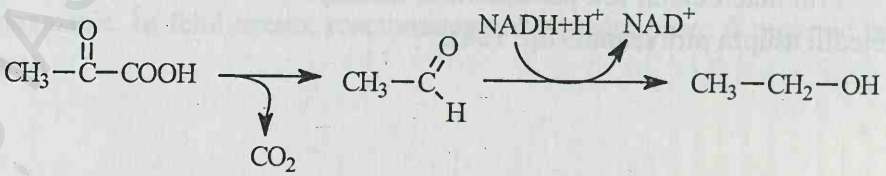


Fig. 128. Reprezentarea schematică a mecanismului de acțiune al piruvat-dehidrogenazei

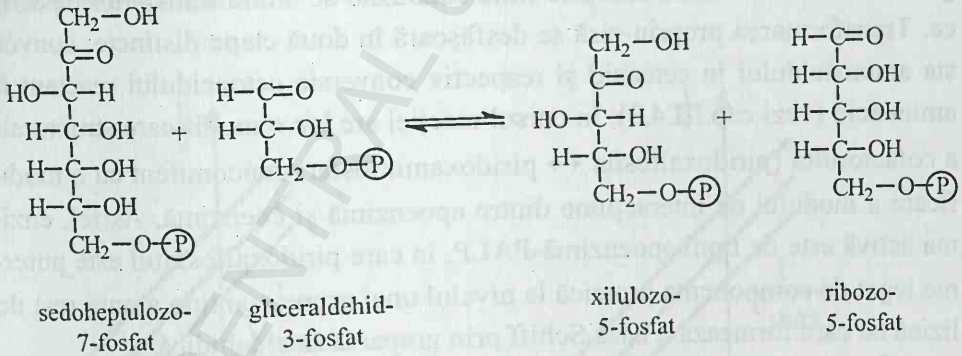
În acest complex multienzimatic tiaminpirofosfatul este un transportor al fragmentului CH_3-C(-)=O. Acetaldehida formată nu este însă liberă ci sub formă de acetil-CoA deoarece în etapa următoare TPP se regenerează cedând fragmentul C_2 rezultat coenzimei A.

În cazul decarboxilării anaerobe a acidului piruvic, etapă importantă a fermentației alcoolice, piruvatul rezultat în calea Embden-Meyerhoff-Parnas este decarboxilat sub acțiunea catalitică a ***piruvat-decarboxilazei*** (EC 4.1.1.1), o enzimă TPP-dependentă. Acetaldehida rezultată nu interacționează însă cu coenzima A, ca în cazul decarboxilării oxidative, ci este redusă sub acțiunea ***alcool-dehidrogenazei*** NAD^+-dependente:



Piruvat-decarboxilaza izolată din drojdia de bere are o masă moleculară de 175 kDa. Fiecare moleculă de apoenzimă conține 3-4 molecule de TPP și același număr de ioni de Mg^{2+}. Rolul acestora este de a stabiliza molecula enzimatică, ei intervenind în legarea TPP la apoenzimă. De altfel, s-a demonstrat practic că legarea fermă a ionilor metalici de apoenzimă se realizează doar în prezența tiaminpirofosfatului. Atât TPP-ul cât și ionii de Mg^{2+} sunt localizați în centrul activ al enzimei, în imediata vecinătate a situsului de legare a substratului.

Cel de-al treilea tip de reacții catalizate de enzimele TPP-dependente îl reprezintă formarea α-cetolilor. Astfel, ***transcetolazele*** catalizează reacții de transfer ale grupărilor cetol de la o aldoză la o cetoză cu formarea unei noi aldoze și a unei noi cetoze. De exemplu, ***transcetolaza (sedoheptulozo–7-fosfat : D – gliceraldehid – 3 – fosfat - glicolaldehid-transferaza,*** EC 2.2.1.1) catalizează reacția reversibilă a sedoheptulozo-7-fosfatului cu aldehida 3-fosfoglicerică când se formează ribozo-5-fosfatul și xilulozo-5-fosfatul:



Transcetolazele prezintă o înaltă specificitate față de cetoze, mai exact preferă o configurație *trans* a atomului de carbon α în raport cu configurația atomului de carbon din poziția β. Mecanismul de reacție este similar cu cel întâlnit în alte reacții catalizate de enzime TPP-dependente.

Într-o primă fază are loc adiția cofactorului la gruparea carbonilică a cetozei cu formarea unui intermediar de tip bază Schiff. Din acesta se scindează mai întâi aldoza, apoi cetoza.

VI.6 MECANISME DE ACȚIUNE ALE UNOR ENZIME PIRIDOXALFOSFAT-DEPENDENTE

Dintre cele trei forme structurale ale piridoxinei (***piridoxolul***, ***piridoxalul*** și ***piridoxamina***) doar piridoxalul poate îndeplini rol coenzimatic sub forma sa fosforilată (***piridoxalfosfat - PALP***). Aceste enzime catalizează o mare diversitate de reacții, în special din metabolismul aminoacizilor:

- transaminarea aminoacizilor;
- decarboxilarea aminoacizilor;
- racemizarea aminoacizilor;
- reacții de α – β-eliminare;
- reacții de β – γ-eliminare;
- biosinteza triptofanului prin utilizarea serinei și indolului în calitate de precursori;
- conversia serinei în glicocol.

Transaminarea aminoacizilor reprezintă una din căile generale de degradare a aminoacizilor, reacțiile fiind catalizate de aminotransferaze specifice. Transformarea propriu-zisă se desfășoară în două etape distincte: conversia aminoacidului în cetoacid și respectiv conversia cetoacidului reactant în aminoacid (vezi cap.III.4.3). În cursul reacției are loc o modificare structurală a cofactorului (piridoxalfosfat ↔ piridoxaminfosfat) concomitent cu o modificare a modului de interacțiune dintre apoenzimă și coenzimă. Astfel, enzima activă este de tipul apoenzimă-PALP, în care piridoxalfosfatul este puternic legat de componenta proteică la nivelul unei grupe ε-amino a unui rest de lizină cu care formează o bază Schiff prin gruparea sa aldehidică.

În prima componentă a transformării, când aminoacidul reactant este convertit în cetoacid, complexul enzimă-substrat, aflat inițial sub formă aldiminică, trece în forma cetiminică. Prin hidroliza acesteia din urmă se formează α-cetoacidul, iar coenzima transformată în piridoxaminfosfat (PAMP) suferă o reorientare spațială rămânând legată de apoenzimă prin legături necovalente.

În realitate, mecanismul de reacție este mult mai complex, el putând fi complet elucidat prin tehnici specifice cineticii rapide care dau următoarele indicații suplimentare:

- cedarea protonului de la atomul de carbon α al aminoacidului este provocată de o stare de rezonanță electronică ce reprezintă fenomenul esențial al transformării;

- urmează un "circuit al protonilor" materializat printr-o succesiune de transformări ce au loc în centrul activ;

- la finele fiecărei componente a transformării apa intervine ca substrat. Acest lucru a fost demonstrat prin utilizarea izotopului ^{18}O când s-a observat că α-cetoacidul format este, de asemenea, marcat. În același timp, moleculele de apă cedează protonii enzimei.

Notând cu A și B cele două substrate, relația vitezei va fi:

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_{max}}\left(1 + \frac{K_A}{[A]} + \frac{K_B}{[B]}\right)$$

în care K_A și K_B sunt constantele Michaelis K_M ale enzimei față de substratul A și respectiv substratul B. Reprezentarea grafică a acestei ecuații respectă total aspectul Lineweaver-Burk (fig. 129).

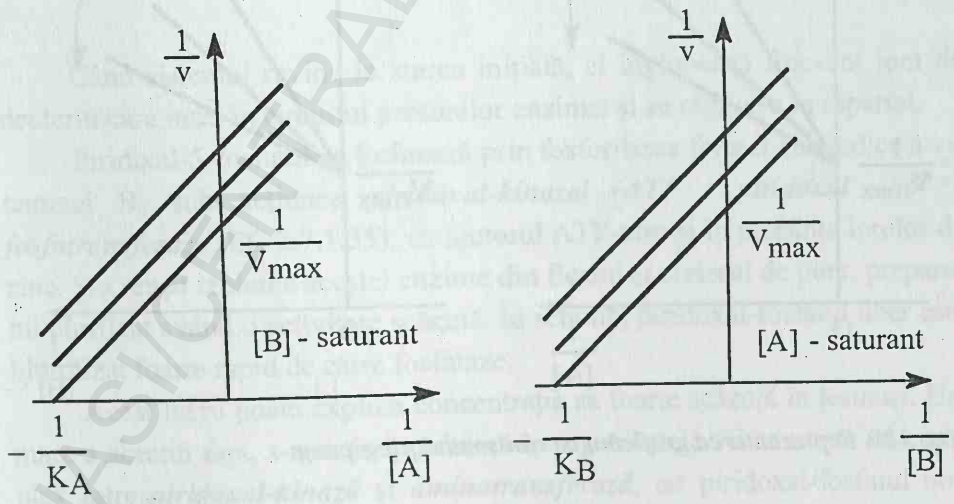


Fig. 129. Graficul Lineweaver-Burk pentru aminotransferaze

Un studiu mult mai amănunțit al mecanismului de acțiune, care este de tip ***ping -pong***, se realizează modificând concentrațiile substratelor A și B în același raport. Dacă se face o soluție conținând cele două substrate în raportul masic $\alpha = [A] / [B]$ și se realizează determinări ale activității catalitice în medii de incubare conținând cantități variabile din această soluție, ecuația de mai sus devine:

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_{max}}\left[1 + \frac{K_A}{[A]} + \frac{\alpha K_B}{[A]}\right] \quad \text{sau}$$

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_{max}}\left[1 + \frac{1}{[A]}\left(K_A + \alpha K_B\right)\right]$$

Reprezentarea grafică a lui 1/v în funcție de 1/[A] este o dreaptă ce intersectează axa ordonatelor în punctul $1/V_{max}$. Același aspect îl are și graficul dependenței dintre 1/v și 1/[B] (fig. 130).

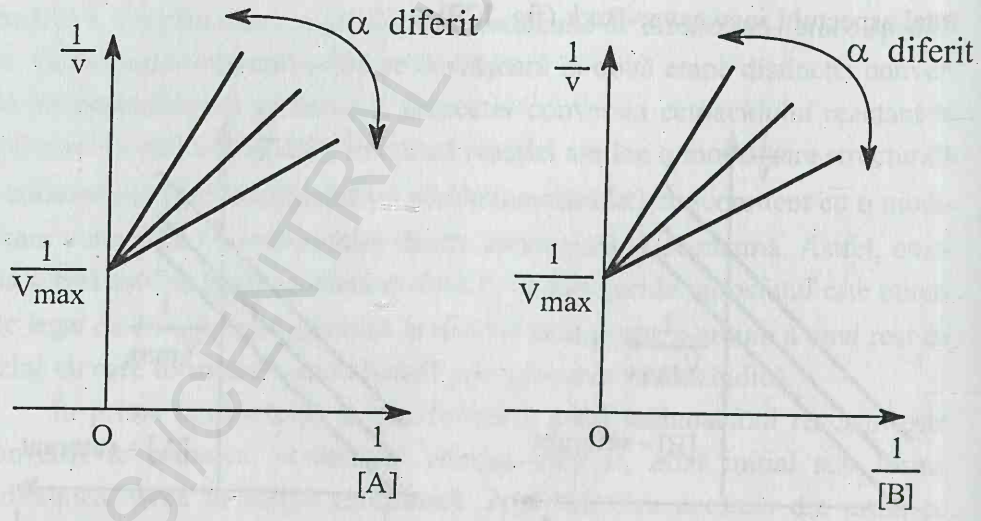
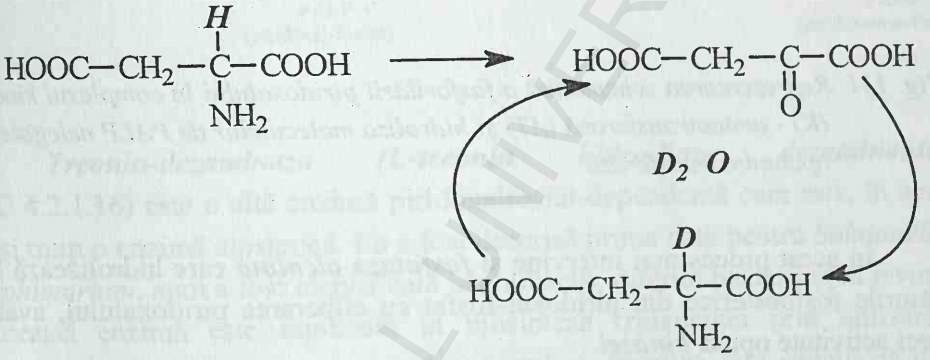


Fig. 130. Reprezentarea grafică a mecanismului ping-pong

Similitudinea graficelor (când pe axa absciselor se trece 1/[A] și respectiv 1/[B]) demonstrează faptul că cele două substrate au efecte simetrice. Doar mecanismul de tip ***ping-pong*** posedă această proprietate. Să presupunem că determinăm activitatea aspartat-aminotransferazei și că pipetăm toate

componentele mediului de incubare, cu excepția α-cetoglutaratului. Are loc conversia totală a piridoxalfosfatului în piridoxaminfosfat. În mediul de reacție apare o cantitate de oxaloacetat stoechiometric corespunzătoare cantității de PALP inițiale. Deci aproape toată cantitatea de acid aspartic rămâne nemodificată. Cu toate acestea, în probă are loc o activitate catalitică intensă dar nedetectabilă.

Toate etapele semireacției sunt reversibile. Cu alte cuvinte, oxaloacetatul format este reconvertit în aspartat în mod continuu și invers. Faptul că fenomenele se petrec în acest mod, poate fi pus în evidență utilizând apa grea (deuterată):



Când sistemul revine la starea inițială, el înglobează frecvent ioni de deuteriu care intră în circuitul protonilor enzimei și se regăsesc în aspartat.

Piridixal-5-fosfatul se formează prin fosforilarea formei aldehidice a vitaminei B_6 sub acțiunea ***piridoxal-kinazei (ATP : piridoxal - 5' - fosfotransferaza***, EC 2.7.1.35), cu ajutorul ATP-ului și în prezența ionilor de zinc. S-a reușit izolarea acestei enzime din ficatul și creierul de porc, preparatul purificat având o activitate scăzută. În schimb, piridoxal-fosfatul liber este hidrolizat foarte rapid de către fosfataze.

Acest lucru poate explica concentrația sa foarte scăzută în țesuturi. Urmare a acestui fapt, s-a emis ipoteza că în organismele vii ar exista un complex între ***piridoxal-kinază*** și ***aminotransferază***, iar piridoxal-fosfatul nou sintetizat se fixează imediat pe apoenzima transferazei, neexistând practic sub formă liberă (fig. 131).

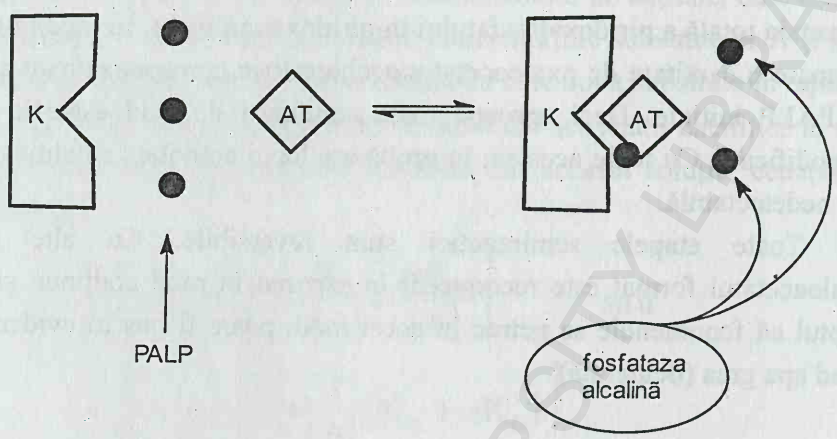
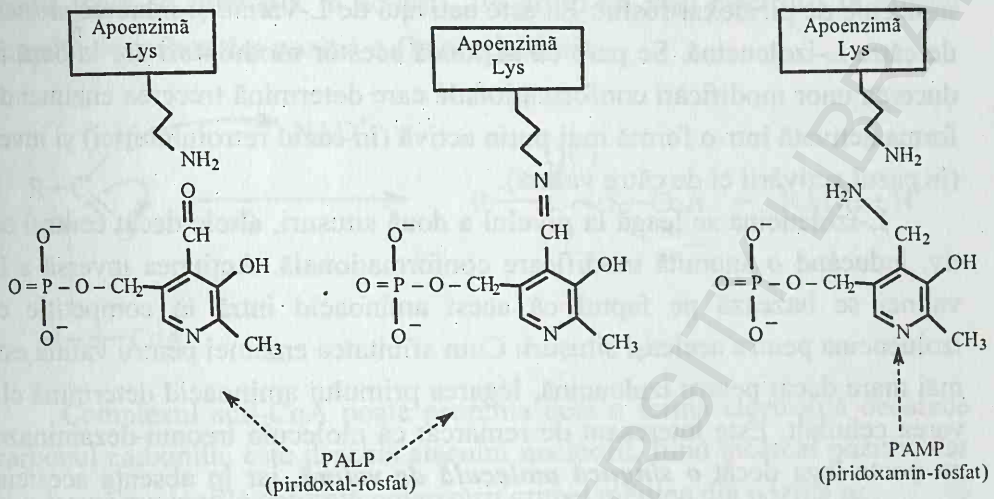


Fig. 131. Reprezentarea schematică a fosforilării piridoxalului în complexul kinază (K) - aminotransferază (AT) şi hidroliza moleculelor de PALP nelegate de apoaminotransferază

În acest proces mai intervine şi ***fosfataza alcalină*** care hidrolizează legăturile fosfoesterice din piridoxal-fosfat cu eliberarea piridoxalului, având deci activitate opusă ***kinazei.***

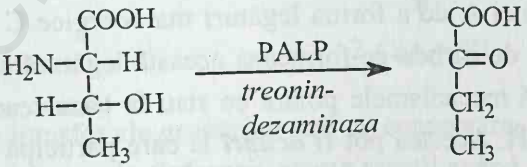
Este interesant faptul că în anumite etape ale reacţiei de transaminare cofactorul enzimatic joacă rol de coenzimă, cele două componente legându-se slab, necovalent, iar în alte etape joacă rol de grupare prostetică, legarea făcându-se puternic, covalent. În afară de aceasta, pe parcursul procesului, piridoxal-5-fosfatul trece în piridoxamin-5-fosfat pentru ca apoi să se regenereze forma aldehidică (piridoxal-5-fosfat):

BCU IAŞI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY



Treonin-dezaminaza ***(L-treonin hidro-liaza dezaminantă,*** EC 4.2.1.16) este o altă enzimă piridoxalfosfat-dependentă care este, în acelaşi timp o enzimă alosterică. Ea a fost descrisă prima dată pentru *Salmonella typhimurium*, apoi a fost identificată la colibacili, diferite bacterii şi în levuri. Această enzimă este implicată în biosinteza izoleucinei prin utilizarea treoninei în calitate de precursor. La rândul ei, treonina este sintetizată din acid aspartic. Această secvență metabolică nu se întâlneşte în organismele animale, pentru acestea treonina şi izoleucina făcând parte din grupul aminoacizilor esențiali.

Reacția catalizată de enzima PALP-dependentă este o dezaminare a treoninei cu formare de α-cetobutirat:



Treonin-dezaminaza este o enzimă oligomeră cu molecula formată din 4 subunități identice, având proprietăți diferite de la o specie microbiană la alta. Enzima din *S. typhimurium* este, de asemenea, un tetramer cu o masă moleculară de 105 kDa care conține două situsuri catalitice şi implicit două

molecule de piridoxal-fosfat. Ea este activată de L-valină şi inhibată alosteric de către L-izoleucină. Se pare că acţiunea acestor modulatori are la bază inducerea unor modificări conformaţionale care determină trecerea enzimei din forma activată într-o formă mai puţin activă (în cazul retroinhibiţiei) şi invers (în cazul activării ei de către valină).

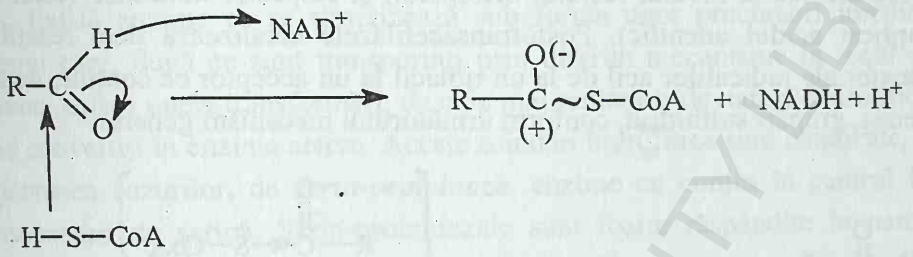
L-izoleucina se leagă la nivelul a două situsuri, altele decât centrul activ, inducând o anumită modificare conformaţională. Acţiunea inversă a L-valinei se bazează pe faptul că acest aminoacid intră în competiţie cu izolueucina pentru aceleaşi situsuri. Cum afinitatea enzimei pentru valină este mai mare decât pentru izoleucină, legarea primului aminoacid determină clivarea celuilalt. Este interesant de remarcat că molecula treonin-dezaminazei nu poate lega decât ***o singură moleculă de valină***, iar în absenţa acesteia, leagă ***două molecule de izoleucină***. Se crede că legarea unei molecule de L-valină determină o anumită modificare conformaţională care împiedică legarea celei de a doua molecule, care, teoretic, ar trebui să interacţioneze cu molecula enzimatică. Din acest punct de vedere, aceasta este ipoteza cea mai plauzibilă dintre cele toate cele emise până în prezent.

VI.7 MECANISME DE ACŢIUNE ALE UNOR ENZIME CE CONŢIN CoA-SH ÎN CALITATE DE COFACTOR

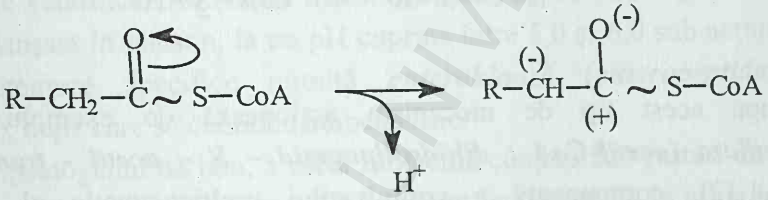
Enzimele CoA-SH-dependente îndeplinesc în organismele vii funcţii importante de transfer a radicalilor acil. Toate enzimele din subsubclasa 6.2.1. catalizează reacţii de formare a tioesterilor coenzimei A din acizi liberi cu ajutorul energiei din ATP (într-un singur caz se utilizează energia din GTP). Mecanismele de reacţie catalizate de aceste enzime se bazează pe capacitatea coenzimei A de a forma legături macroergice C ~ S (vezi III.5.2). Faptul că atomul de carbon ce formează această legătură este un carbon carbonilic determină mecanismele polare ce stau la baza reacţiilor în care este implicată CoA-SH. Acestea pot fi ***acilări*** la care participă gruparea carbonil polarizată şi respectiv ***condensări*** în care atomul de carbon din poziţia α este încărcat negativ.

În cursul activării acizilor carboxilici sub formă de acil-CoA, enzima accelerează formarea tioesterului printr-un mecanism general bazic la nivelul grupării -SH. După formarea acestuia, reacţiile în care sunt implicate grupările acil pot avea loc fie printr-o deplasare nucleofilă la atomul de carbon car-

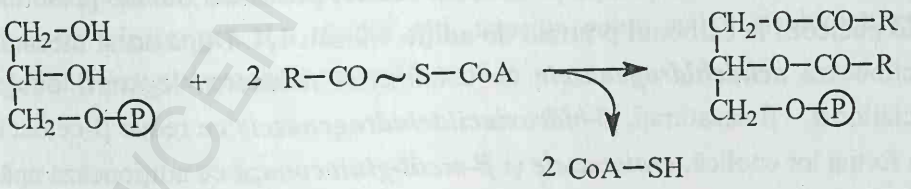
bonilic (cum se întâmplă în acilări), fie printr-un atac electrofil la nivelul atomului de carbon din poziția α (în condensări):



Complexul acil-CoA poate prezenta deci o formă electrofilă deoarece carbonul carbonilic este deschis atacului nucleofil, fiind încărcat pozitiv, dar şi o formă nucleofilă datorată polarizării grupei metilen din poziția α:



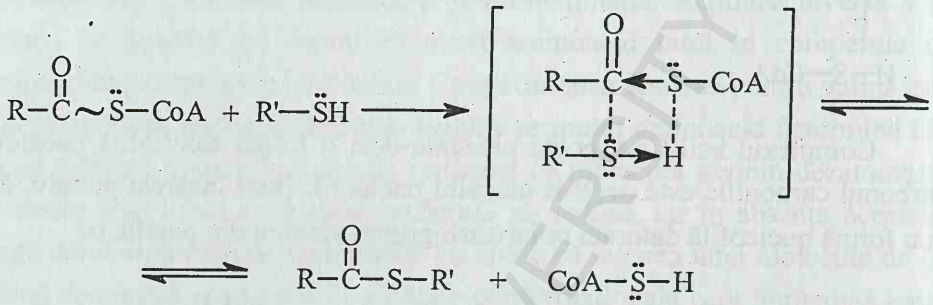
În reacțiile de acilare, calitatea de agent nucleofil poate fi îndeplinită nu numai de ionii HO^- rezultați prin disocierea apei ci şi din grupele –OH alcoolice. De exemplu, ***fosfoglicerolacilaza*** catalizează reacția de esterificare a glicerol-3-fosfatului cu formare de acid fosfatidic:



Reacțiile de transfer ale grupărilor acil cu conservarea energiei legăturii tioesterice sunt catalizate de ***tioforaze***, aceste reacții având loc prin mecanismul substituției nucleofile:

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Reacțiile de transfer ale grupărilor acil când acceptorul este un compus fosforilat sunt reversibile și sunt catalizate de ***fosfotransacetilaze*** (când scindarea are loc la nivelul restului ortofosfat) și respectiv ***tiokinaze*** (când este implicat acidul adenilic). Fosfotransacetilazele catalizează deci reacții de transfer ale radicalilor acil de la un tiolacil la un acceptor ce conține, de asemenea, grupări sulfhidrid, conform următorului mecanism general:



După acest tip de mecanism acționează de exemplu **lipoat-*transacetilaza*** (***acetil-CoA : dihidrolipoamid – S – acetil - transferaza***, EC 2.3.1.12), componentă a complexului multienzimatic al ***piruvat-dehidrogenazei.***

Reacțiile care au loc prin atac nucleofil la carbonul din poziția α a acizilor grași α – β nesaturați au la bază polarizarea legăturii duble în așa fel încât se formează un carbanion la atomul α și respectiv un carbocation la atomul de carbon din poziția β. În urma acestei polarizări devine posibil atacul nucleofil la carbonul β urmat de adiție 1,2 sau 1,4. După acest mecanism acționează ***acildehidrogenazele*** ce catalizează reducerea legăturii duble a acizilor α – β nesaturați, ***β-hidroxiacildehidrogenazele*** ce reduc β-cetoacizii la forma lor enolică, ***crotonazele*** și ***β-metil-glutaconaza*** ce adiționează apă la α – β -enoil-derivați și altele.

Reacțiile ce au loc prin atac electrofil la atomul de carbon din poziția α au la bază fenomenul de polarizare a legăturii C–H vecină cu carbonul carbonilic. Prin cedarea protonului astfel format unor acceptori specifici se creează un ion carbanium. Când carbonul încărcat negativ reacționează cu un compus carbonilic el polarizează gruparea carbonilică adiționând în felul acesta substituentul nucleofil.

VI.8 CONVERSIA ZIMOGENILOR ÎN ENZIME ACTIVE

Există enzime ce se sintetizează sub forma unor precursori imediați inactivi care, după ce sunt transportați prin diferite mecanisme la locul de acțiune, suferă unele transformări, de cele mai multe ori de natură hidrolitică, fiind convertiți în enzime active. Aceste scindări hidrolitice sunt catalizate, în majoritatea cazurilor, de ***serin-proteinaze***, enzime ce conțin în centrul lor activ resturi de serină. Serin-proteinazele sunt foarte răspândite în natură formând o familie de enzime cu acțiune similară și un mecanism asemănător cu mecanismul prin care acționează unele esteraze.

Tripsina și ***chimotripsina*** sunt sintetizate în pancreas sub forma zimogenilor lor - ***tripsinogenul*** și respectiv ***chimotripsinogenul***, lipsiți de capacitate catalitică. Activarea tripsinogenului cu formarea tripsinei active este declanșată în intestin, la un pH cuprins între 5,0 și 6,0 sub acțiunea unei serin-proteinaze specifice numită ***enterokinază*** (***enteropeptidază***, EC 3.4.21.9), după care se continuă autocatalitic.

Tripsinogenul de bou, a cărui moleculă conține 229 resturi de aminoacizi, este activat prin clivarea unui fragment hexapeptidic în urma hidrolizei legăturii peptidice dintre resturile de aminoacizi din pozițiile 6 și 7 (fig. 132).

Această scindare hidrolitică poate fi autocatalitică deoarece restul de aminoacid din poziția 6 este un rest de lizină, iar tripsina scindează de regulă legăturile peptidice formate de lizină sau arginină. După eliminarea fragmentului hexapeptidic, noua moleculă de tripsină activă poate activa o nouă moleculă de tripsinogen. La rândul său, tripsina poate activa și chimotripsinogenul, respectiv procarboxipeptidaza A.

BCU IAȘI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

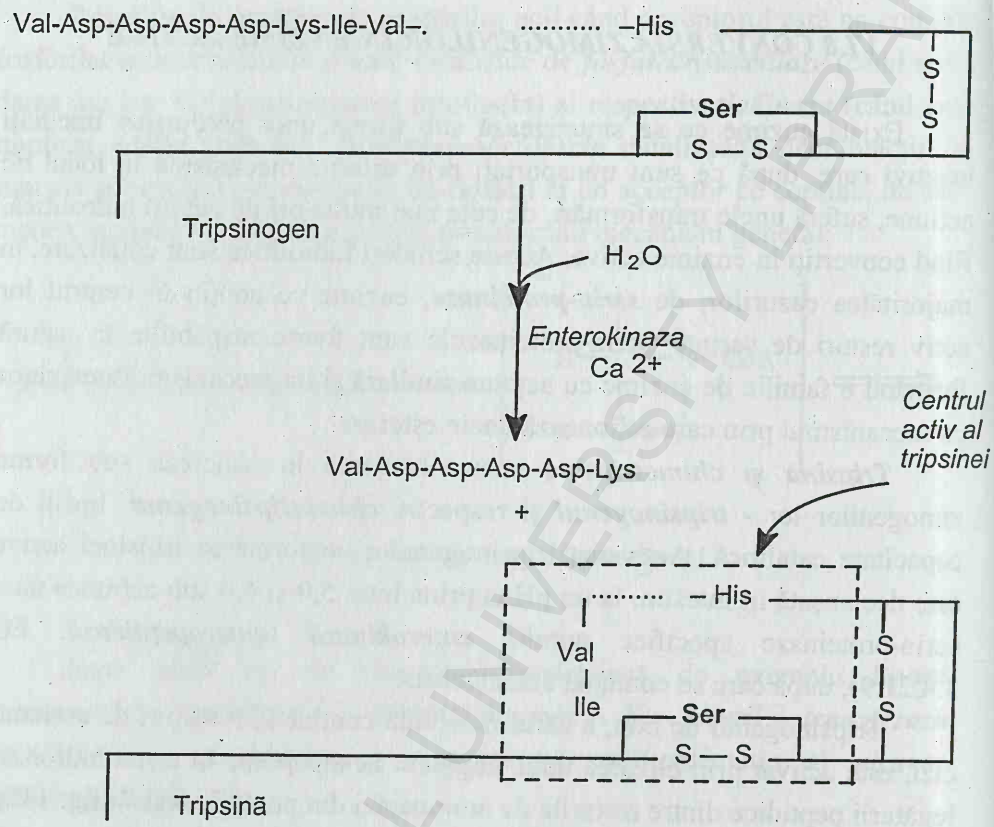


Fig. 132. Reprezentarea schematică a mecanismului activării tripsinogenului (Vl. Artenie – 1991)

Chimotripsinogenul de bou are molecula formată din 245 resturi de aminoacizi, iar activarea sa se realizează prin scindarea hidrolitică a mai multor legături peptidice. Dintre acestea, un rol determinant îl prezintă hidroliza legăturii peptidice dintre resturile de aminoacizi 15 şi 16. În acelaşi timp se realizează scindarea legăturilor peptidice dintre resturile de aminoacizi 14-15, 146-147 şi respectiv 147-148. Tripeptida 1-3 nu se elimină deoarece restul Cys_1 din capătul N-terminal formează o punte disulfurică cu un rest de cisteină dintr-o cu totul altă zonă a catenei polipeptidice.

Resturile Ser_{195} şi His_{57} ocupă o poziţie esenţială în centrul activ al chimotripsinei (fig. 133).

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

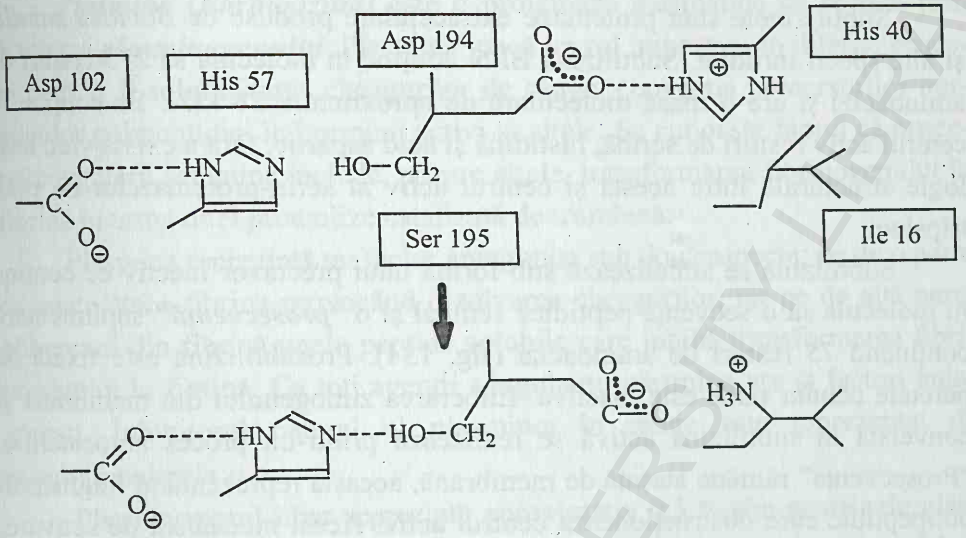


Fig. 133. Reprezentarea schematică a interacțiunii dintre resturile de aminoacizi ce formează centrul activ al chimotripsinei

Aceste resturi interacționează cu Asp_{102} prin punți de hidrogen ce facilitează transportul de protoni. Deplasarea unui proton va converti gruparea alcoolică a serinei în ion alcoolat, esențial pentru atacul asupra substratului și formarea enzimei acilate.

Stabilizarea centrului activ se realizează prin formarea unei legături ionice între resturile Asp_{194} și His_{40}. Odată cu formarea acestor interacțiuni, apare o sarcină pozitivă liberă la nivelul Ile_{16} care dislocă restul Asp_{194} din poziția sa. Aceasta se îndepărtează de His_{40} apropiindu-se de Ile_{16} antrenând și restul de Ser_{194}, precum și alte grupări esențiale. Acesta este fenomenul principal ce are loc în procesul de activare a zimogenului și care determină o serie de modificări conformaționale menite să deschidă cavitatea hidrofobă a centrului activ ce conține un rest de metionină.

Subtilizina. Multă vreme s-a crezut că toate serin-proteinazele formează o grupă unică de enzime al căror mecanism de activare și a căror funcționare conservă modelul ancestral. Această ipoteză a fost infirmată prin studiul proteinazelor microbiene numite ***subtilizine*** ce prezintă o organizare spațială total diferită.

Subtilizinele sunt proteinaze extracelulare produse de *Bacillus subtilis* şi alte specii înrudite. Subtilizina BPN conţine în molecula sa 275 resturi de aminoacizi şi are o masă moleculară de aproximativ 28 kDa. Ea conţine în centrul activ resturi de serină, histidină şi acid aspartic, fără a exista vreo analogie structurală între acesta şi centrul activ al serin-proteinazelor de tipul tripsinei.

Subtilizina se sintetizează sub forma unui precursor inactiv ce conţine în molecula sa o secvenţă peptidică semnal şi o ***"prosecvenţă"*** suplimentară conţinând 75 resturi de aminoacizi (fig. 134). Prosubtilizina este fixată de peretele celular unde este inactivă. Eliberarea zimogenului din membrană şi conversia în subtilizină activă se realizează printr-un proces autocatalitic. "Prosecvenţa" rămâne ataşată de membrană, aceasta reprezentând fragmentul polipeptidic care obstrucţionează centrul activ. Acest mecanism de activare, denumit în mod plastic ***"coada şopârlei"*** este unic în seria proteinazelor, neexistând nici o altă peptidază care să participe la procesul de activare.

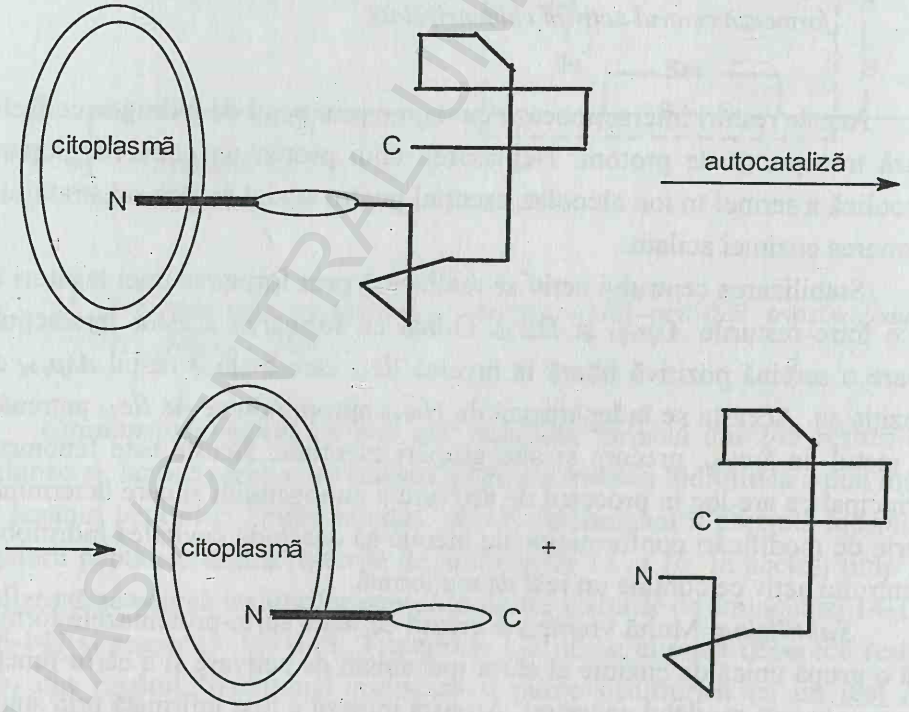


Fig. 134. Activarea prosubtilizinei prin autocataliză

BCU IAŞI CENTRALĂ UNIVERSITARĂ LIBRARY

Plasmina* (*fibrinolizina*)** este o proteinază plasmatică ce rezultă prin activarea ***plasminogenului. Plasmina joacă un rol important în diferite procese cum ar fi solubilizarea cheagurilor de sânge, conversia precursorilor hormonilor polipeptidici în hormoni activi şi altele. Se cunoaşte faptul că procesul coagulării sanguine include, printre altele, transformarea fibrinogenului în fibrină în urma unei proteolize catalizată de trombină.

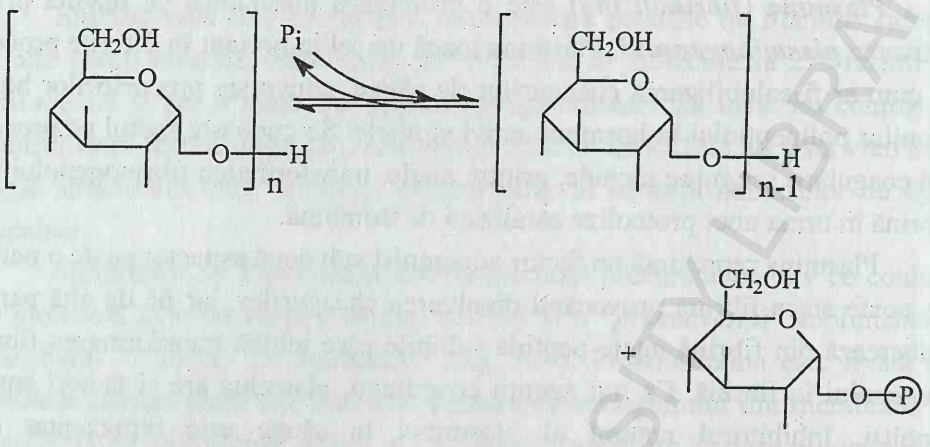
Plasmina reprezintă un factor antagonist sub două aspecte: pe de o parte ea poate ataca fibrina provocând dizolvarea cheagurilor, iar pe de altă parte eliberează din fibrină unele peptide solubile care inhibă transformarea fibrinogenului în fibrină. Ca toţi agenţii coagulanţi, plasmina are şi factori antagonişti. Inhibitorul natural al plasminei în sânge este reprezentat de macroglobulinele α_2.

Plasminogenul liber reprezintă aproximativ 0,5 % din proteinele plasmatice, iar activarea sa se realizează atât sub acţiunea plasminei (deci autocatalitic) cât şi sub acţiunea unor factori tisulari şi sanguini care acţionează asupra plasminogenului ca proteaze specifice. Plasminogenul uman are o masă moleculară de 92 kDa şi conţine numeroase punţi disulfidice ce stabilizează molecula. Aceasta conţine trei bucle în care există câte 5 legături disulfhidice.

Plasmina activă este o serin-proteinază ce conţine în situsul catalitic aceeaşi triadă ca şi tripsina (serină, histidină şi aspartat), iar conversia zimogenului în enzimă activă se face prin clivarea unui fragment polipeptidic de la capătul C-terminal în urma scindării legăturii peptidice dintre resturile de Arg_{560} şi Val_{561}. După scindarea acestei legături, plasmina rezultată este instabilă şi realizează imediat hidroliza legăturii peptidice dintre două resturi de lizină succesive (76-77). Polipeptida rezultată din extremitatea N-terminală conţine 76 resturi de aminoacizi şi este eliberată extrem de uşor, nefiind legată prin nici o punte disulfidică.

Plasmina activă posedă o specificitate largă de acţiune, similară cu cea a tripsinei: ea atacă nu numai fibrina ci şi alte proteine, implicate în procesul coagulării sau chiar din structura peretelui celular.

Glicogen-fosforilaza* (*α- 1,4 – D - glucan : ortofosfat - α- D - glucozil-transferaza, EC 2.4.1.1) este o enzimă ce catalizează depolimerizarea glicogenului în zonele sale liniare:



Glucozo-1-fosfatul rezultat este consumat rapid prin izomerizarea sa în glucozo-6-fosfat care intră în glicoliză. Enzima există sub două forme: o formă fosforilată numită ***fosforilază a*** care este catalitic activă şi o formă nefosforilată numită ***fosforilază b***, inactivă. Activarea enzimei se traduce prin conversia fosforilazei b în forma a, această transformare fiind reversibilă. Din această cauză, enzima este supusă reglării prin două mecanisme paralele:

- un control alosteric sub acţiunea diferiţilor efectori;
- un control realizat prin fosforilare şi defosforilare, modificare covalentă ce se realizează la nivelul unui rest de serină din secvenţa polipeptidică.

La concentraţii constante de glicogen, viteza de reacţie cu care fosforilaza b trece în fosforilaza a activă depinde de concentraţia celuilalt substrat (ortofosfat), iar AMP-ul este un activator al procesului (fig. 135).

Atât fosforilaza b (forma defosforilată) cât şi fosforilaza a (forma fosforilată) pot exista sub două forme conformaţionle, aflate în echilibru, formele **T** (mai puţin active) şi formele **R** (mai active). Moleculele de AMP şi nucleotidele similare favorizează conformaţiile R, acţionând ca activatori. Pe de altă parte, glucoza, glucozo-6-fosfatul, ATP-ul şi ADP-ul favorizează conformaţia T a fosforilazei b.

BCU IAŞI - UNIVERSITY LIBRARY

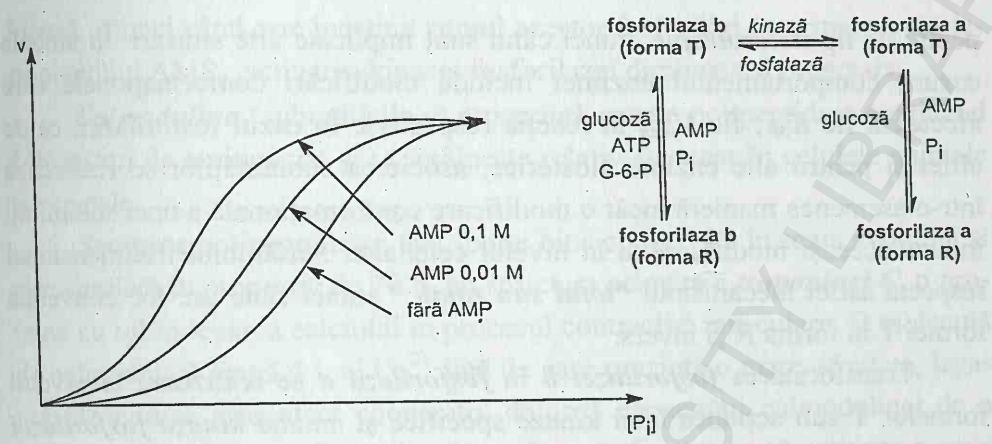


Fig. 135. Reprezentarea schematică a conversiei fosforilazei b în fosforilaza a. În stânga: graficul dependenței vitezei de activare a fosforilazei în funcție de concentrația AMP-ului

Prin cristalografie în raze X s-a demonstrat că fiecare subunitate a enzimei, care conține 841 resturi de aminoacizi, conține mai multe situsuri: situsul de legare a glicogenului, situsul pentru glucozo-fosfat, situsul de legare a glucozei şi respectiv situsul de legare a nucleotidului. Acesta din urmă a fost identificat prin studiul structurii secundare când a fost pus în evidență un domeniu de legare a mononucleotidului.

Foarte interesant este faptul că în fiecare subunitate a fost identificată prezența a câte unei molecule de piridoxal-fosfat. Această coenzimă este localizată în afara centrului activ şi nu participă la realizarea actului catalitic. Pe de altă parte, piridoxalfosfatul este cofactorul unor enzime implicate în metabolismul aminoacizilor liberi, fiind total indiferent față de resturile de aminoacizi din apoenzimă. Atunci când AMP-ul şi radicalii fosfat se găsesc în cantități relativ crescute, enzima (care este deja în forma R) tinde să dimerizeze din nou pentru a forma o moleculă tetrameră.

Cum poate fi detectat în mod practic efectul alosteric în acest caz ? De regulă, efectele alosterice se întâlnesc în cazul enzimelor ce îndeplinesc roluri cheie în diferite căi metabolice.

Efectul alosteric mai intervine, de asemenea, în funcționarea receptorilor, a proteinelor implicate în mecanismele de reglare şi control etc. Se cunoaşte faptul că interacțiunile dintre proteine şi liganzi sunt de tip ***homotropic*** dacă acestea se realizează la nivelul situsurilor catalitice şi res-

pectiv de tip ***heterotropic*** atunci când sunt implicate alte situsuri. În ambele cazuri, comportamentul enzimei include modificări conformaționale care afectează fie K_M, fie V_{max} în reacția respectivă. În cazul fosforilazei, ca de altfel și pentru alte enzime alosterice, asocierea subunităților se realizează într-o asemenea manieră încât o modificare conformațională a unei subunități induce aceeași modificare și la nivelul celeilalte. Ansamblul tridimensional respectă astfel mecanismul ***"totul sau nimic"*** atunci când are loc conversia formei T în forma R și invers.

Transformarea ***fosforilazei b*** în ***fosforilază a*** se realizează la nivelul formelor T sub acțiunea unei kinaze specifice și anume ***kinaza fosforilazei*** (***ATP : fosforilaza b - fosfotransferaza***, EC 2.7.1.38), activată la rândul ei de alte protein-kinaze. Această enzimă are o masă moleculară de peste 300 kDa și conține în molecula sa 16 catene polipeptidice ce formează o structură de tipul $(\alpha,\beta,\gamma,\delta)_4$. Dintre acestea, catenele α și β sunt subunități catalitice. Subunitățile δ sunt capabile să lege ionii de calciu și reprezintă ***calmodulina***.

Subunitățile β sunt primele care suferă fosforilarea sub acțiunea protein-kinazei și activează la rândul lor subunitățile catalitice γ fără disociere. Subunitățile α se fosforilează mult mai lent. Aceste subunități modifică conformația protomerilor β facilitând defosforilarea acestora. În momentul în care subunitățile β s-au defosforilat este indusă și defosforilarea catenelor α astfel încât, în final, toți protomerii pierd radicalii ortofosfat, iar complexul este din nou inactivat.

Altfel spus, catenele α nu sunt fosforilate decât atunci când este finalizată fosforilarea catenelor β. Aceeași succesiune este respectată și în ceea ce privește ordinea clivării ortofosfatului: subunitățile α se defosforilează abia atunci când subunitățile β au fost deja defosforilate.

Deoarece catenele α sunt cele ce declanșează defosforilarea catenelor β, ele vor declanșa, cu o oarecare întârziere, propria lor defosforilare, realizându-se în felul acesta un grad foarte fin de reglare. La rândul ei, fosforilarea catenelor β determină activarea complexului enzimatic în ansamblu. Acest proces este declanșat indirect de către AMP_c atunci când concentrația acestuia este suficient de crescută. Capacitatea catalitică a complexului enzimatic este menținută atâta timp cât se realizează fosforilarea permanentă a subunităților β de către protomerii α și a acestora din urmă de către protein-

kinază. Atunci când este încetinit ritmul acestor fosforilări ca urmare a scăderii nivelului AMP_c, activarea kinazei fosforilazei diminuează progresiv.

Calmodulina (subunitățile γ) reprezintă catene polipeptidice conținând 148 resturi de aminoacizi şi se întâlneşte relativ frecvent în celulele animale şi vegetale.

Secvența polipeptidică a fost foarte bine conservată în scara evoluției şi este similară în proporție de 70 % cu structura primară a ***troponinei C***, o proteină cu rol în legarea calciului în procesul contracției musculare. O moleculă de calmodulină leagă 4 ioni Ca^{2+} față de care prezintă o mare afinitate, legarea făcându-se prin efect cooperativ datorită capacității calmodulinei de a exista în mai multe conformații active. Aceasta face ca ea să activeze o serie de proteine celulare atunci când concentrația Ca^{2+} creşte. Fiecare ion de calciu se leagă de componenta polipeptidică prin câte 6 legături din care 4 cu grupe carboxilice ionizate ale resturilor de aspartat şi/sau glutamat.

Celula expulzează continuu ioni de calciu cu ajutorul ATP-azei, menținând concentrația intracelulară sub 0,1 μM. Sub acțiunea unui stimul extracelular, calciul poate reintra în celulă până la o concentrație de 10 μM. În felul acesta el acționează ca un ***mesager secundar*** asupra calmodulinei în acelaşi mod în care AMP_c acționează asupra protein-kinazei. Datorită subunităților sale α, β şi calmodulină, fosforilaza este supusă unui control dublu din partea AMP-ului ciclic şi calciului.

Calmodulina poate influența şi alte kinaze? Recent s-a evidențiat faptul că există cel puțin cinci tipuri de kinaze activate în urma interacțiunii calmodulinei cu calciul. Două dintre ele (kinaza fosforilazei şi miozin-kinaza) prezintă o înaltă specificitate, iar celelalte trei sunt mai puțin specifice şi sunt notate cu I, II şi III. Kinaza II poate acționa, printre altele, asupra glicogen-sintetazei şi tirozin-hidroxilazei, iar kinaza III acționează asupra factorului EF-2 implicat în procesul biosintezei proteice.

Acest factor este esențial pentru elongarea catenei polipeptidice nou formate la nivel ribozomal. Fosforilarea sa la nivelul unui rest de treonină deblochează elongarea. Acest mecanism stă la baza modului de acțiune al unor hormoni şi factori de creştere care declanşează intrarea calciului în celule ca urmare a activării kinazei III şi implicit a diminuării temporare a biosintezei proteice.

În țesutul muscular, kinaza fosforilazei accelerează, după cum s-a arătat, conversia fosforilazei b în fosforilaza a. Fosforilarea se realizează la nivelul restului Ser_{14} din fiecare monomer, aceasta reprezentând ultima verigă a unei cascade de fosforilări plecând de la semnalul inițial. Mușchiul conține o ***fosfoprotein-fosfatază*** (***fosfoprotein-fosfohidrolaza***, EC 3.1.3.16) al cărei rol este de a cliva resturile ortofosfat din moleculele diferitelor proteine fosforilate. La rândul ei, această fosfatază este controlată de către AMP_c. Ca urmare, protein-kinaza activată de AMP_c fosforilează, printre altele, o proteină care se comportă apoi ca un inhibitor al fosfoprotein-fosfatazei. Creşterea concentrației AMP-ului ciclic determină o activare a fosfatazei. În acelaşi timp, kinaza inactivează prin fosforilare alte enzime (de exemplu glicogen-sintetaza). Are loc deci un control fin prin două efecte contrare: o cascadă rezultată prin stoparea biosintezei glicogenului şi mobilizarea sa sub formă de glucoză fosforilată (fig. 136).

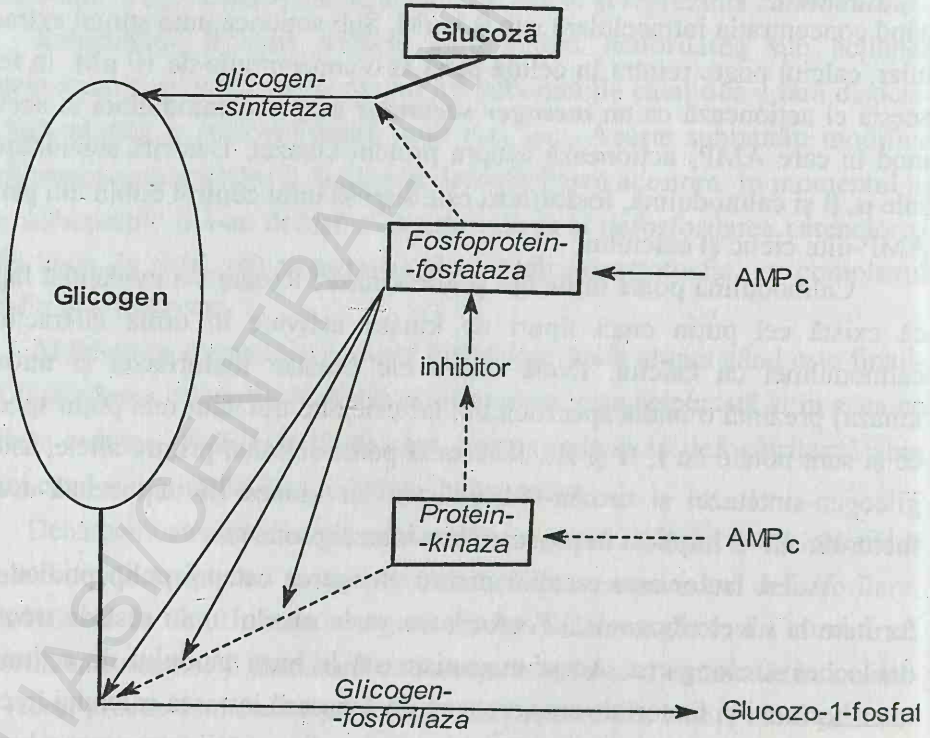


Fig. 136. Reprezentarea schematică a reglării fosforilazei. Prin săgeți întrerupte este reprezentată activarea, iar prin săgeți continue – inhibiția

BCU IAȘI/CENTRALĂ UNIVERSITARĂ

VII ASPECTE ENERGETICE ALE REACȚIILOR ENZIMATICE

Energia rezultată în procesele de degradare din organismele vii este stocată sub două forme principale:

- în legăturile macroergice ale moleculelor de ATP;
- sub forma unui ***potențial electrochimic*** transmembranar, numit în mod curent ***potențial de membrană.***

Aceste două "rezerve" energetice sunt comunicante în sensul că energia potențialului de membrană poate trece sub forma legăturilor macroergice de ATP şi invers. Datorită existenței ATP-azei membranare, potențialul de membrană poate fi utilizat în sinteza moleculelor de ATP aşa cum se întâmplă în fosforilarea oxidativă şi invers, hidroliza ATP-ului sub acțiunea ATP-azelor permite reîncărcarea potențialului de membrană (fig. 137).

Este posibil ca acest proces, invers fosforilării oxidative, să nu îndeplinească un rol fiziologic important decât în cazul membranelor microbiene. În afară de legăturile macroergice ale ATP-ului, energia mai poate fi stocată şi în alte molecule macroergice cum ar fi creatin-fosfatul, fosfoenolpiruvatul, acil-CoA etc. ATP-ul necesar proceselor biosintetice poate fi generat pe două căi diferite:

- ***fotosinteza*** şi ***respirația*** - fenomene ce au loc la suprafața unor membrane (cloroplaste respectiv membrana internă mitocondrială). Aceste procese generează un potențial de membrană care este convertit în ATP sub acțiunea ATP-sintetazei (care este de fapt H^+-ATP-aza ce poate acționa într-un sens sau în altul în funcție de condițiile concrete din celulă);
- ***reacțiile catabolice*** şi de ***fosforilare*** în fază solubilă (glicoliza, ciclul Krebs etc.) (fig. 136). Există modalități de consum energetic simultan din ambele rezerve cum ar fi acțiunea decuplanților fosforilării oxidative de tipul dinitrofenolului sau a altor agenți ce măresc permeabilitatea membranei pentru protoni (*D.C.Cojocaru - 1986*).

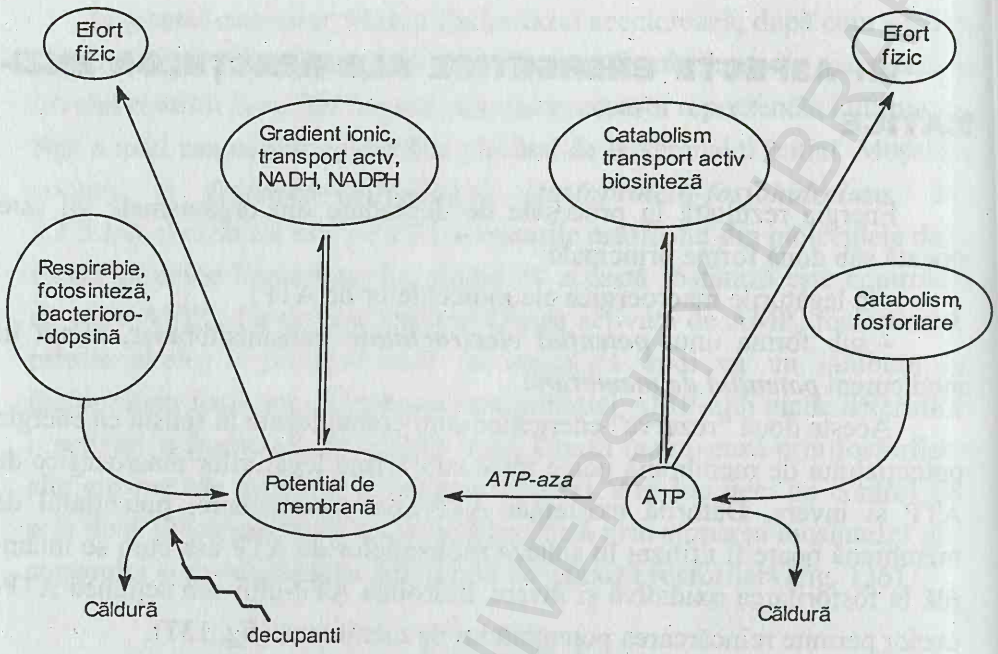


Fig. 137. Reprezentarea schematică a interdependenței dintre cele două forme sub care este stocată energia în organismele vii

Dispariția potențialului de membrană determină o intensificare a hidrolizei ATP-ului în tendința accentuată de a regenera această diferență de potențial membranar. Atunci când activitatea ATP-azei este inhibată de ***oligomicină*** sau alți reactanți specifici, rezerva de ATP rămâne intactă în pofida existenței decuplantului și continuă să-și îndeplinească rolul (biosinteze, contracție musculară, transport activ de tip 2 etc.). Aceste principii stau la baza metodelor experimentale prin care se determină sursa de energie utilizată într-un proces sau altul. În prezența unui inhibitor al ATP-azei, decuplantul inhibă instantaneu potențialul de membrană și are o acțiune întârziată asupra ATP-azei.

Principalele surse de ATP sunt reprezentate de metabolismul substratelor fosforilate și respectiv catena respiratorie (fig. 138).

BCU INSTITUTUL CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

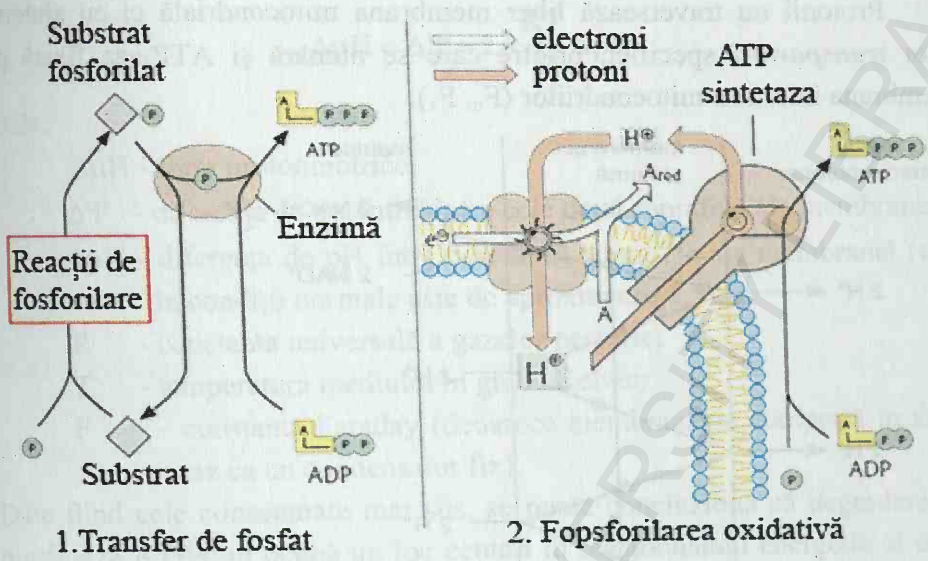


Fig. 138. Generarea ATP-ului prin transfer de radicali fosfat (1) şi fostorilare oxidativă (2) (Koolman, J. – 2005)

Un exemplu concludent al transportului activ prin potențialul de membrană (de tip 1) îl reprezintă ***translocarea ATP/ADP*** la nivelul membranei interne mitocondriale. Moleculele de ADP au o sarcină negativă în minus față de ATP, ceea ce determină tendința de expulzare a câte unei molecule de ATP în schimbul alteia de ADP care intră în matrice (fig. 139). Oxidarea unui substrat sub acțiunea unei dehidrogenaze specifice este însoțită în mod curent de reducerea NAD^+ cu formare de NADH. Dacă reacția are loc în citosol, electronii sunt transportați în interiorul mitocondriei prin mecanisme specifice.

Atunci când aceşti electroni reapar în mitocondrie sub formă de NADH, această coenzimă se oxidează în catena respiratorie. Funcționarea acesteia determină expulzarea protonilor în exterior, când se realizează transportul electronilor la nivelul a trei verigi ale catenei respiratorii :

- transferul de la complexul I (NADH-dehidrogenază) la ubichinonă;
- transferul electronilor de către complexul III (citocrom b şi c_1) între coenzima Q şi citocromul c;
- la nivelul complexului IV ce corespunde citocrom c oxidazei (citocrom $a+a_3$).

Protonii nu traversează liber membrana mitocondrială ci cu ajutorul unor ***transportori*** specifici, printre care se numără şi ATP-aza fixată pe membrana internă a mitocondriilor (F_o, F_1).

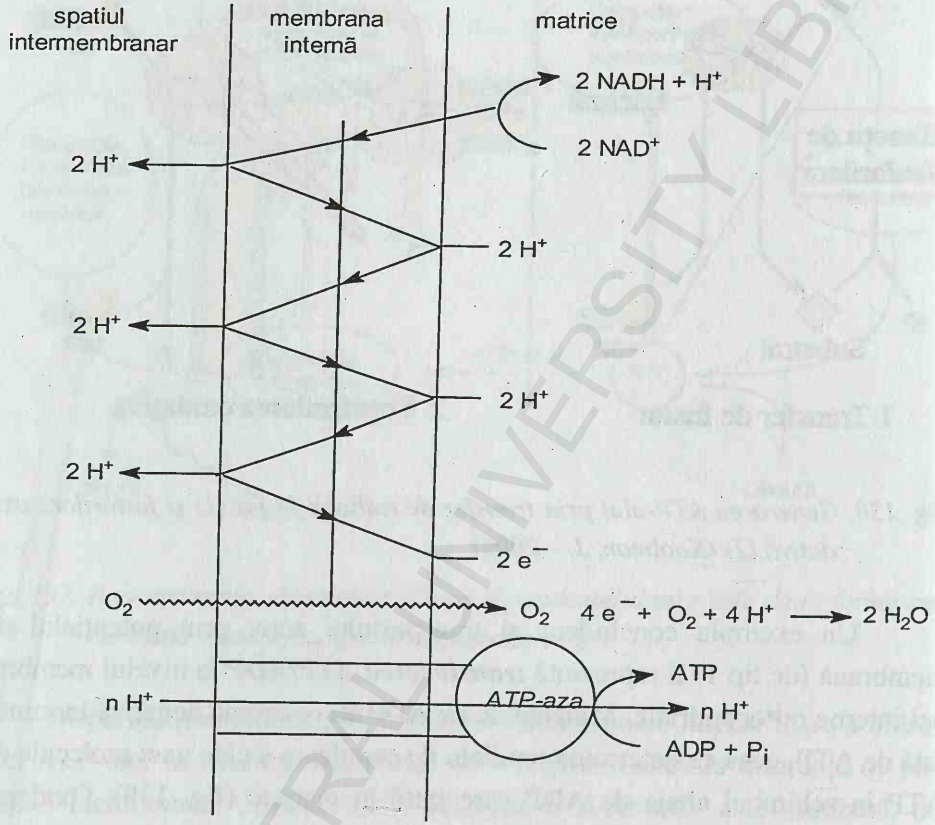


Fig. 139. Reprezentarea schematică a generării energiei în catena respiratorie

Această enzimă este înglobată parțial în membrană şi catalizează în mod normal scindarea ATP-ului în ADP şi fosfor anorganic (***H^+-ATP-aza***). Reîntoarcerea a doi protoni în interior determină deplasarea echilibrului reacției în sens invers, deci de biosinteză a ATP-ului (***ATP-sintetaza***).

Alți transportori pot schimba protonii externi cu alți cationi. În oricare din aceste situații se creează o asimetrie a sarcinilor electrice care constituie potențialul electrochimic generator de ATP. Diminuarea acestei diferențe de potențial se face de către ATP cu ajutorul unui "curent" de protoni. Apare deci o adevărată ***forță protonmotrice*** ce poate fi evaluată în volți (sau mili-volți) ca orice forță electromotoare:

$$\Delta\mu H = \Delta\Psi - 2{,}3\frac{RT}{F}\Delta pH$$

unde:

$\Delta\mu H$ - forța protonmotrice;

$\Delta\Psi$ - diferența de potențial între cele două suprafețe ale membranei;

ΔpH - diferența de pH între cele două suprafețe ale membranei (care în condiții normale este de aproximativ 1,5);

R - constanta universală a gazelor perfecte;

T - temperatura mediului în grade Kelvin;

F - constanta Faraday (deoarece membrana se comportă în acest caz ca un condensator fix).

Date fiind cele consemnate mai sus, se poate concluziona că degradarea și biosinteza ATP-ului ocupă un loc central în metabolismul energetic al celulei, acesta reprezentând principalul compus macroergic în organismele vii (fig. 140).

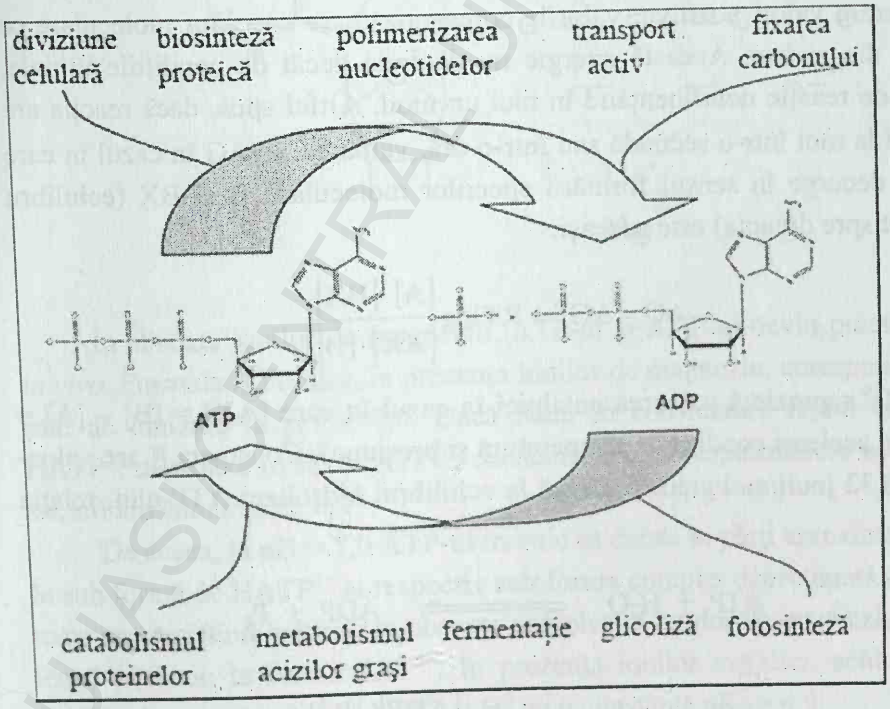


Fig. 140. Principalele căi metabolice cuplate cu generarea și respectiv consumul de ATP (McCarty, R. E. et al. – 2003)

VII.1 MOLECULE MACROERGICE

Toate transformările biochimice catalizate de transferaze se realizează prin transferul unui atom sau unor grupe de atomi (care pot fi şi grupe funcționale) de la un donor la un acceptor:

$$AX + B \underset{\text{transferază}}{\rightleftharpoons} A + BX$$

Din considerente termodinamice, mediul conținând cele 4 specii moleculare existente la echilibru se consideră a forma un sistem închis. Acest sistem evoluează de la o stare inițială caracterizată prin concentrații date ale reactanților (substanțele AX şi B) către o stare finală.

Pentru simplificarea raționamentelor matematice, să considerăm că variațiile de concentrație ce au loc în timpul transformării în raport cu concentrațiile inițiale, pot fi neglijate. Variația energiei libere (entalpiei) produsă de reacția unui mol de substrat AX şi un mol de B este ΔG. Prin convenție, să considerăm valori pozitive, valorile corespunzătoare speciilor moleculare ce rezultă din sistem. Această energie nu depinde decât de condițiile inițiale, timpul de reacție neinfluențând în nici un mod. Altfel spus, dacă reacția are loc mol la mol într-o secundă sau într-o oră, valoarea lui ΔG în cazul în care reacția decurge în sensul formării speciilor moleculare A şi BX (echilibru deplasat spre dreapta) este aceeaşi:

$$\Delta G = \Delta G^{o} + RT\log\frac{[A]\cdot[BX]}{[AX]\cdot[B]}$$

unde ΔG^{o} reprezintă valoarea entalpiei în cazul în care [AX] = [B] – [A] = [BX] (în aceleaşi condiții de temperatură şi presiune). Constanta R are valoarea de 8,32 jouli/mol·grad. Aplicată la echilibrul hidrolizei ATP-ului, relația devine:

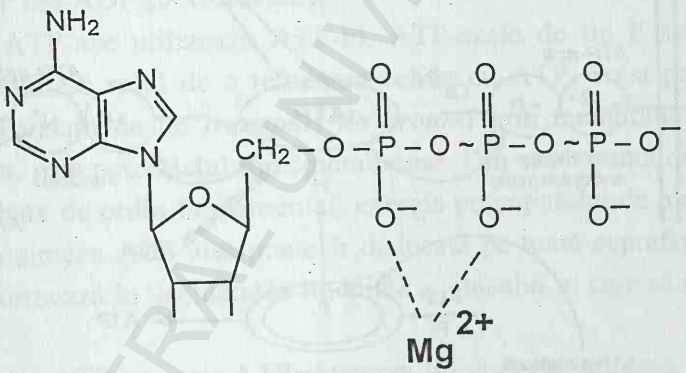
$$ATP + H_2O \rightleftharpoons ADP + P_i$$

$$\Delta G = \Delta G^{o} + RT\log\frac{[ADP]\cdot[P_i]}{[ATP]}$$

BCU IAŞI CENTRALĂ UNIVERSITARĂ LIBRARY

La echilibrul reacției de hidroliză a ATP-ului, valoarea ΔG° este de -29 KJ/mol la 25°C şi pH=7,0. Hidroliza ATP-ului în AMP şi pirofosfat corespunde unei valori pentru ΔG° mult mai mare (-36,12 KJ/mol). Pentru o reacție spontană, fără intervenția unui catalizator, $\Delta G^{\circ}<0$. Valorile negative ale entalpiei în cazul hidrolizei ATP-ului arată că reacția ar fi spontană în condiții standard: $[ATP]=[ADP]=[P_i]$.

Nu trebuie să uităm însă că *in vivo*, în toate reacțiile biochimice nu participă molecule de ATP libere ci sub forma unor complecşi cu ioni metalici, în special cu ioni Mg^{2+}. Fără aceşti ioni, atât ATP-ul cât şi ADP-ul sunt inerți în celulă. Toate enzimele ce utilizează ATP sau ADP în calitate de substrat necesită prezența ionilor Mg^{2+} sau alți ioni bivalenți care exercită o influență asupra stării de ionizare a nucleotidului:



În absența ionilor de magneziu, ATP-ul şi ADP-ul devin practic inerți *in vivo*. Formula ATP-ului, în prezența ionilor de magneziu, corespunde stării sale de ionizare la pH = 7,0. Dacă luăm în considerare faptul că acidul $HATP^{3-}$ disociază în H^+ şi ATP^{4-}, constanta pK_a corespunzătoare acestei disocieri are valoarea de 6,9.

De aceea, la pH = 7,0 ATP-ul trebuie să existe în părți aproximativ egale sub formă de $HATP^{3-}$ şi respectiv sub forma complet deprotonată (ATP^{4-}), toate acestea fiind valabile în absența completă a ionilor de magneziu care se leagă puternic la forma ATP^{4-}. În prezența ionilor metalici, acidul Mg – $HATP^-$ disociază în Mg – ATP^{2-} şi H^+ cu o constantă $pK_a = 4,9$.

În toate celulele vii, ATP-ul reprezintă o sursă energetică uşor disponibilă şi regenerabilă. Cuplarea între biosinteza şi hidroliza ATP-ului este de o

B.C.U. „M. EMINESCU" IAŞI
BIOLOGIE

importanță capitală pentru celule, deoarece necesitățile energetice ale acestora sunt foarte mari. Pentru a evalua cantitativ importanța regenerării ATP-ului este suficient să reamintim că în corpul uman, în fiecare zi, se sintetizează o cantitate de ATP care reprezintă cel puțin jumătate din propria sa greutate.

Această reciclare continuă este rezultatul activității unor ATP-aze, activitate însoțită de un flux de ioni ce traversează membranele (fig. 141).

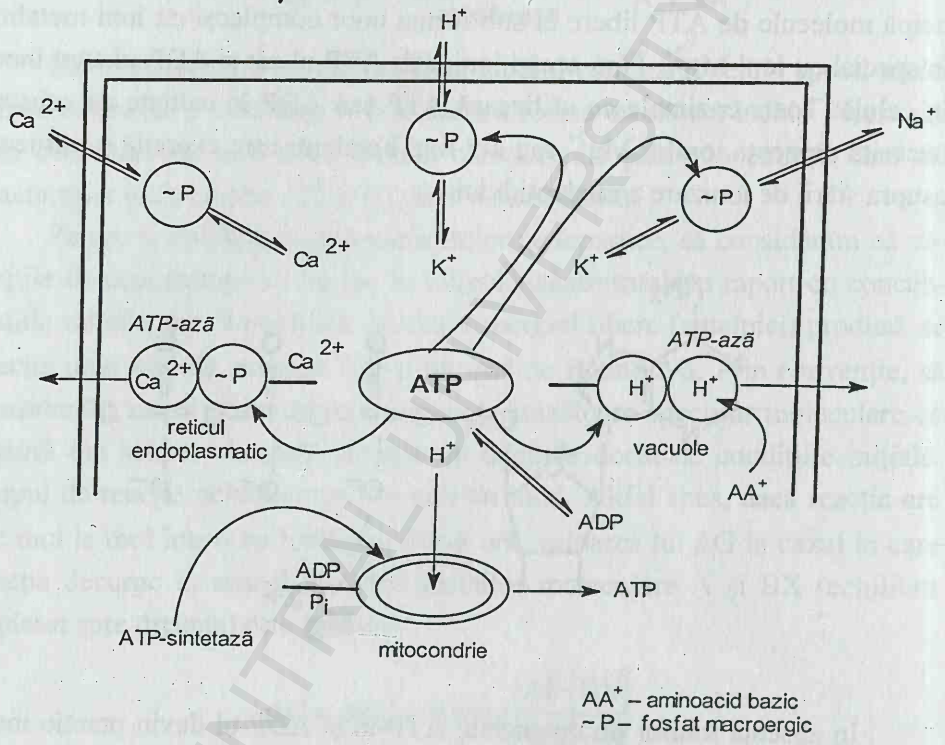


Fig. 141. Reprezentarea schematică a consumului și regenerării ATP

Din această cauză, enzimele respective se numesc ***ATP-aze ionofore***. *Pedersen* și *Carafoli* (1987) includ în grupul acestora trei clase principale de ATP-aze:

- ***ATP-azele de tip P*** reprezentate de ATP-azele ce transportă ionii de Ca^{2+}, H^+, sau schimbul ionilor de Na^+ și K^+ de o parte și alta a membranelor la eucariote. Mecanismul lor de reacție include formarea unui intermediar fosforilat covalent. În aceeași categorie intră și ATP-aza Ca^{2+}-dependentă din

reticulul endoplasmatic şi ATP-aza transportoare de potasiu din unele specii bacteriene;

- ***ATP-aze de tip V*** localizate în membranele organitelor subcelulare, altele decât mitocondriile şi sarcoplasmă. Ele sunt reprezentate de ATP-azele din vacuole, lisosomi, endosomi, vezicule Golgi şi funcţionează ca „pompe de protoni" când se expulzează câte 2 H^+ pentru fiecare moleculă de ATP hidrolizată;

- ***ATP-aze de tip F*** reprezentate de ATP-azele de tip F_o, F_1 localizate în mitocondrii şi în bacterii, cu excepţia arhebacteriilor la care se întâlnesc ATP-aze similare cu cele de tip V de la eucariote.

În mod plastic, autorii compară interrelaţiile dintre aceste tipuri de ATP-aze ca raporturile dintre stăpâni şi sclavi. „Stăpânii" sunt ATP-azele din mitocondrii şi cloroplaste ce funcţionează, în principal ca ATP-sintetaze deci sintetizează ATP din ADP şi ortofosfat.

Celelalte ATP-aze utilizează ATP-ul. ATP-azele de tip F sau ATP-sintetazele îndeplinesc rolul de a reîncărca celula cu ATP, acest proces de biosinteză fiind însoţit de un ***transport de protoni*** prin membrană care se realizează direct, prin potenţialul transmembranar. Din acest punct de vedere se pune o întrebare de ordin fundamental: energia potenţialului de membrană utilizată pentru sinteza ATP-ului poate fi dislocată pe toată suprafaţa membranei sau se formează în vecinătatea imediată a situsului în care se realizează reacţia?

Altfel spus, ATP-aza sau ATP-sintetaza ţin cont de valoarea medie a potenţialului într-o regiune vastă a membranei sau numai de valoarea diferenţei de potenţial locală? Într-o serie de experimente efectuate cu vezicule membranare reconstituite s-a creat artificial un gradient de protoni. În acest caz nu s-a putut răspunde la întrebarea de mai sus deoarece s-a obţinut un potenţial relativ uniform la suprafaţa întregii membrane.

S-a recurs atunci la dubla inhibiţie în particule membranare intacte ce realizează fosforilarea oxidativă. Activitatea ATP-azică a fost inhibată în proporţie de 50 % cu DCCD. Un alt inhibitor specific, antimicina, blochează numai o parte din complecşii catenei respiratorii. Blocarea activităţii ATP-azice cu DCCD se realizează prin mecanismul ***„totul sau nimic"***. Acelaşi principiu se respectă şi la blocarea complecşilor enzimatici din catena respiratorie.

Dacă o parte din aceştia este blocată de către DCCD, cum se comportă ceilalţi complecşi? Dacă sursa de energie utilizată pentru funcţionarea lor este repartizată pe toată suprafaţa membranei, toate particulele de ATP-aze rămân intacte, deci funcţionează normal. Sinteza de ATP rezidual va fi proporţională cu activitatea respiratorie totală care persistă după inhibiţia provocată de antimicină.

Dacă din contră, sursa de energie este localizată local, în jurul fiecărei molecule de ATP-ază, un anumit număr de complecşi neinhibaţi de către DCCD, care ar trebui deci să funcţioneze, sunt scoşi din circuit, chiar şi cei localizaţi în afara zonei unde se realizează oxidarea. De aceea, inhibiţia unei părţi a complecşilor respiratorii de către antimicină va avea repercusiuni mai accentuate asupra biosintezei ATP-ului decât în cazul precedent.

Rezultatele experimentale pledează în favoarea celei de a doua variante. Economia celulară poate fi interpretată prin existenţa celor două rezerve energetice amintite mai sus care comunică între ele la nivelul activităţii ATP-azice.

Toate ATP-azele de tip F au o masă moleculară mai mare de 450 kDa şi conţin un număr diferit de catene polipeptidice: 8 în cazul enzimei din *E.coli*, 8 sau 9 la cea din cloroplaste, 10 sau mai multe în ATP-aza mitocondrială din levuri şi cel puţin 13 în cazul mitocondriilor din inima de bou. Din punct de vedere structural, aceste enzime sunt formate din două componente notate cu F_o şi F_1, din care componenta F_o face parte integrantă din structura membranei (fig. 142).

Această componentă se mai numeşte şi ***ATP-ază inhibată de oligomicină*** după efectul pe care acest inhibitor îl manifestă asupra sintezei de ATP în mitocondriile animale. Oligomicina nu are acelaşi efect şi asupra celulelor microbiene deşi şi în acest caz se utilizează simbolul F_o pentru zona membranară omoloagă. Componenta F_1 este responsabilă direct de activitatea ATP-azică şi este orientată spre matricea mitocondrială, respectiv spre citoplasma microbiană.

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

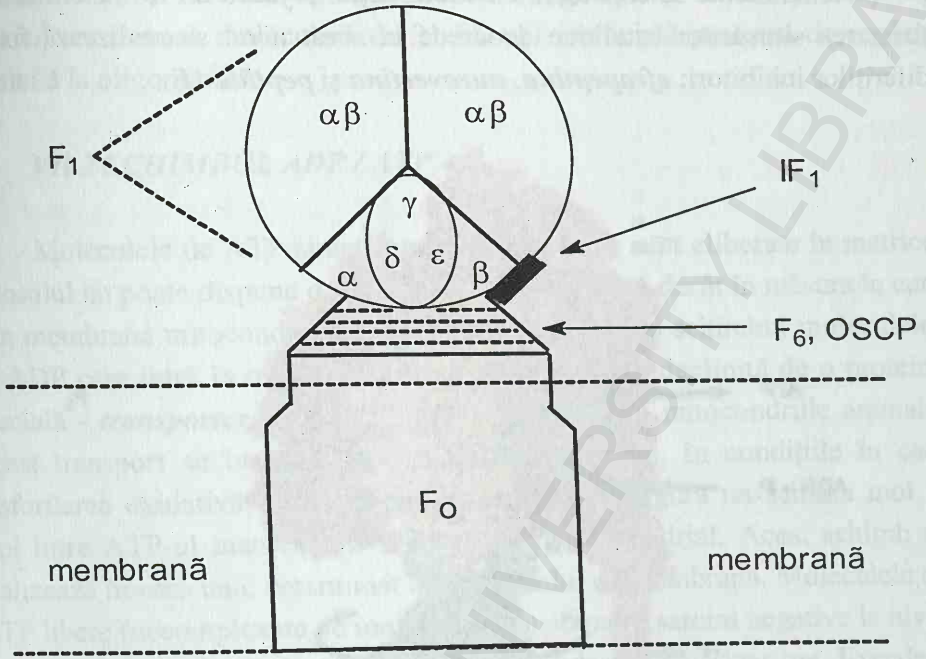


Fig. 142. Reprezentarea schematică a structurii ATP-azei mitocondriale

Componenta F_1 corespunde ATP-azei propriu-zise dar ea nu este capabilă să hidrolizeze ATP-ul dacă este solubilizată prin clivare din complexul F_oF_1. Structura componentei F_1 este întotdeauna aceeaşi la toate organismele superioare: cinci catene polipeptidice care alcătuiesc un complex de tipul $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\varepsilon$. Ea poate fi clivată de factorul F_o, fie prin tratare alcalină, fie prin tratare cu ultrasunete.

Factorul IF_1 este un inhibitor de natură polipeptidică ce conţine 84 resturi de aminoacizi şi care interacţionează cu enzima la nivelul unei catene β atunci când îşi exercită rolul său reglator (fig. 143).

Numărul situsurilor ce poate fixa nucleotidul pe F_1 este de 6 în cazul enzimei din *E. coli,* din care 3 sunt situsuri catalitice situate la nivelul interfeţei dintre subunităţile β şi α şi alte 3 situsuri necatalitice la nivelul catenelor α. Acestea din urmă joacă probabil un rol structural în ansamblul complexului şi/sau unul reglator.

Actualmente se consideră că subunitățile β joacă un rol determinant în formarea situsurilor catalitice deoarece la acest nivel se realizează fixarea diferiților inhibitori: ***efrapeptina***, ***aurovertina*** și ***peptida IF$_1$***.

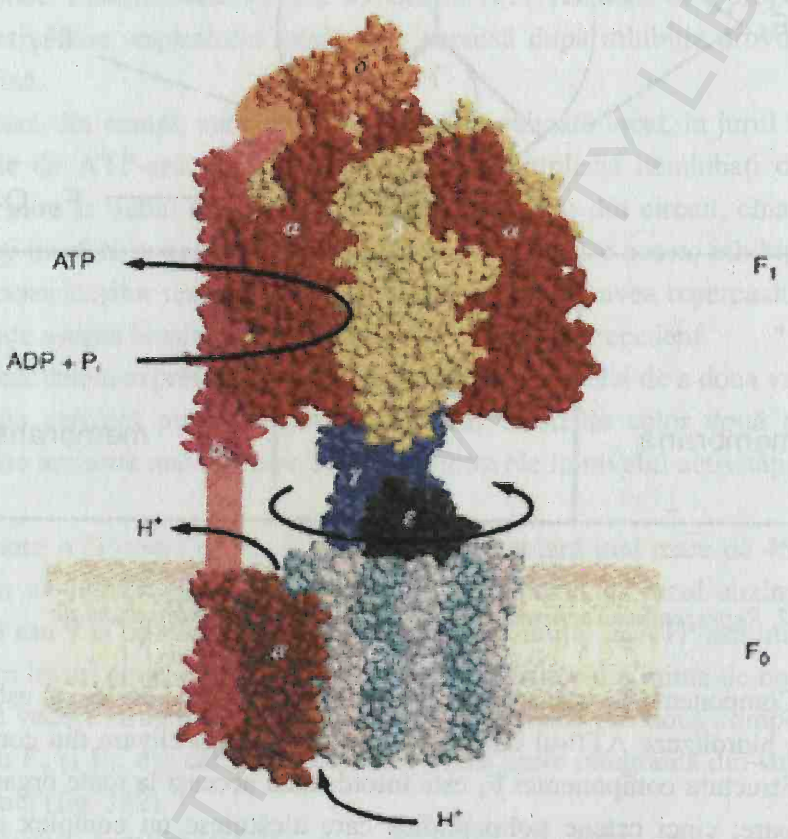


Fig. 143. Modelul localizării membranare a ATP-azei mitrocondriale (Branca, D. – 2005)

Componenta F_o înglobată în membrană, joacă un rol esențial în mecanismul de conservare a energiei asigurând transportul protonilor în cursul sintezei ATP-ului. Nu se cunoaşte cu exactitate numărul de protoni transportați prin membrană în cursul sintezei unei singure molecule de ATP. Mulți autori înclină să considere un raport de 2 sau 3 protoni pentru fiecare moleculă de ATP. Componenta F_o este considerată ca un canal pentru vehicularea protonilor ce declanşează în F_1 o serie de modificări conformaționale necesare procesului biosintetic. Ea este formată din cel puțin 8 catene polipeptidice. Dintre acestea, două subunități, OSCP şi F_6 participă direct la asocierea com-

ponentelor F_o şi F_1. Subunitatea OSCP (*oligomycine sensitive coupling protein*) are o masă moleculară de 21 kDa şi reprezintă proteina de cuplare sensibilă la oligomicină.

VII.2 SCHIMBUL ADP / ATP

Moleculele de ATP sintetizate în mitocondrii sunt eliberate în matrice. Citosolul nu poate dispune de această sursă energetică decât în măsura în care prin membrana mitocondrială este expulzat ATP-ul în schimbul moleculelor de ADP care intră în matrice. Această funcție este îndeplinită de o proteină specială - ***transportorul de ADP/ATP*** - existentă în mitocondriile animale. Acest transport se bazează pe următorul mecanism: în condițiile în care fosforilarea oxidativă funcționează, transportorul asigură un schimb mol la mol între ATP-ul matriceal şi ADP-ul extramitocondrial. Acest schimb se realizează în sens unic determinat de potențialul de membrană. Moleculele de ATP libere (necomplexate de ionii de Mg^{2+}) au patru sarcini negative la nivelul resturilor ortofosfat, în timp ce moleculele de ADP au doar trei. Excedentul de sarcini pozitive de la suprafața externă a membranei compensează dezechilibrul creat prin acest schimb, cu condiția ca fiecare moleculă de ATP expulzată să fie înlocuită cu câte una de ADP care intră, deci transportul este ***electrogenic***. Operațiunea implică un consum energetic. Se consideră că aproape o treime din energia stocată în potențialului de membrană se consumă în acest proces (fig. 144).

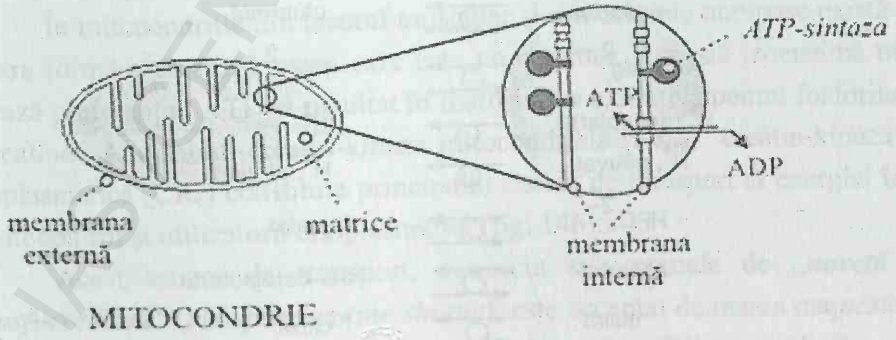


Fig. 144. Localizarea sistemului ATP-ază/ATP-sintetază la nivelul membranei interne mitocondriale (Brandolin, G. et al. – 1993)

Transportorul de ADP/ATP din mitocondriile din inima de bou a fost intens studiat cunoscându-se astăzi că este o proteină membranară ce conține câteva subunități identice, probabil 4, fiecare reprezentată de câte o catenă polipeptidică formată din 297 resturi de aminoacizi (*Block, M. R. et al.* – 1986). Această proteină a fost studiată atât în cazul mitocondriilor intacte cât și în veziculele membranare izolate, precum și sub formă solubilizată în urma acțiunii unor detergenți specifici, remarcându-se un comportament similar cu cel al unei enzime: fixarea de liganzi, activitate (schimb de nucleotide) și respectiv susceptibilitate la acțiunea inhibitorilor. Structura primară a acestei proteine se caracterizează prin existența a trei fragmente omoloage care au aproximativ aceeași lungime și organizare spațială asemănătoare (*Pedersen, P. I.* – 1993). Transportorul de ADP/ATP nu este însă singurul care posedă această structură caracterizată prin existența celor trei fragmente. S-a demonstrat astfel că o structură similară se întâlnește și la alți transportori mitocondriali cum ar fi de exemplu transportorii de anioni. Toți aceștii transportori formează o familie de proteine caracterizată printr-o mare omologie structurală. La nivelul membranei interne mitocondriale există cel puțin zece asemenea transportori cu rol în transportul transmembranar al diferiților metaboliți (fig. 145).

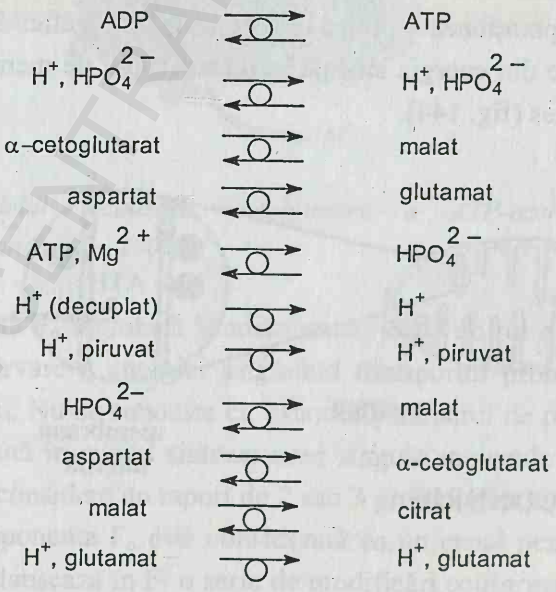
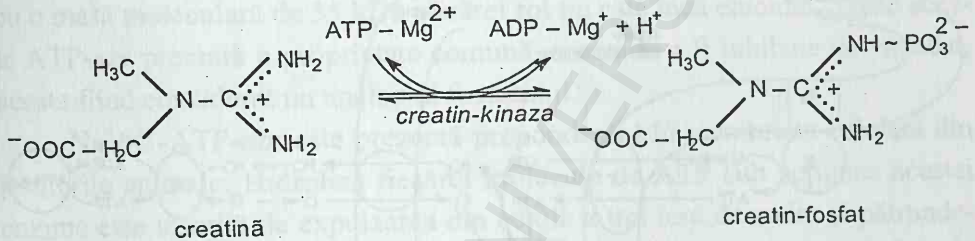


Fig. 145. Principalii metaboliți ce traversează membranele mitocondriale cu ajutorul transportorilor specifici (Pedersen, P. I. et al. – 1993)

VII.3 STRUCTURA ŞI MECANISMUL DE ACȚIUNE AL CREATIN-KINAZEI

Relativ recent (*Clottes, E. şi Vial, Ch.* 1993), a fost clarificat un alt mecanism ce stă la baza exportului de energie intramitocondrială. Acest mecanism se realizează în țesutul muscular, nervos etc., adică în țesuturi în care procesele fiziologice şi biochimice necesită un consum energetic mare. Acest mecanism este asigurat de ***izoenzimele creatin-kinazei*** ce catalizează următoarea reacție:



creatină creatin-fosfat

Creatin-kinaza este o enzimă dimeră formată din două subunități ce pot fi de **tip M** (întâlnite în enzima din țesutul muscular) sau de **tip B** (pentru enzima din țesutul nervos). Creatin-kinaza din citosol poate exista sub 3 forme izoenzimatice: **MM** care predomină în celulele musculare, **BB** în celulele nervoase şi respectiv forma hibridă **MB** prezentă în cantități mici în inimă, plămâni şi stomac. Această formă hibridă poate fi obținută şi artificial prin precipitarea şi redizolvarea unui amestec al formelor dimere **MM** şi **BB**.

În mitocondriile din țesutul muscular şi din celulele nervoase există o a patra formă a creatin-kinazei care este un octamer. Această izoenzimă utilizează preferențial ATP-ul rezultat în fosforilarea oxidativă pentru fosforilarea creatinei. Ansamblul creatin-kinaza mitocondrială (CK_m) creatin-kinaza citoplasmatică (CK_c) constituie principalul sistem de transport al energiei între mitocondrii şi utilizatorii citoplasmatici (fig. 146).

Acest sistem de transport, cunoscut sub numele de *„navetă de fosfocreatină"* (*phosphocreatine shuttle*), este acceptat de marea majoritate a cercetătorilor. Conform acestui model, fosfocreatina (PCr) reprezintă vectorul legăturilor macroergice între cele două compartimente ale ATP-ului.

Creatinfosfatul nu este metabolizat în timpul transportului decât de creatin-kinază. Pe de altă parte, membranele mitocondriale sunt mult mai

permeabile pentru creatinfosfat decât pentru ATP. Creatin-kinaza mitocondrială este fixată pe membrana internă unde catalizează formarea creatinfosfatului plecând de la creatină şi ATP nou sintetizat prin fosforilare oxidativă. Creatin-kinaza din citosol (liberă sau asociată altor structuri subcelulare), regenerează ATP-ul catalizând reacţia inversă. Unii autori contestă rolul vectorial al creatin-kinazei mirocondriale considerând că această enzimă este implicată în metabolismul energetic prin controlul concentraţiei de substrat.

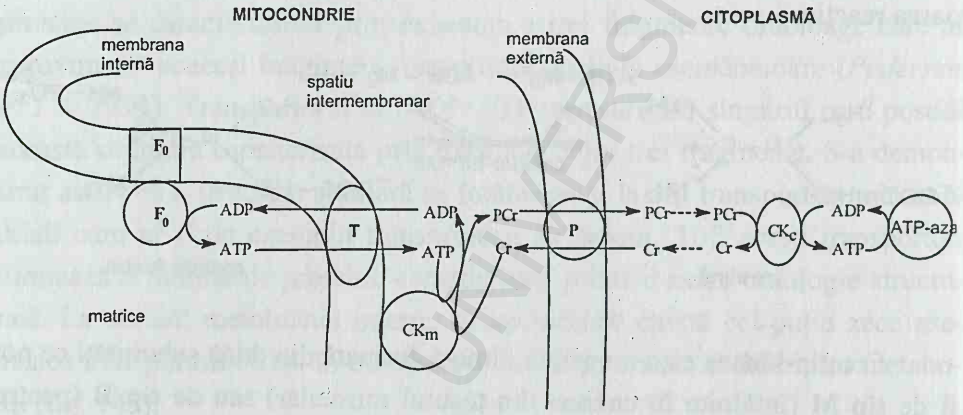


Fig. 146. Reprezentarea schematică a exportului energiei mitocondriale prin intermediul creatinfosfatului; T-transportor de nucleotide adenilice; CK_m - creatin-kinaza mitocondrială; F_0, F_1 - ATP-sintetaza; PCr - creatinfosfat; Cr - creatină; P - por; CK_c - creatin-kinaza citoplasmatică (*Clottes, E. et al.* – 1993)

Importanţa biochimică şi fiziologică a creatin-kinazei este demonstrată de faptul că prin suprimarea creatinei sau utilizarea unor analogi structurali nemetabolizabili se limitează dezvoltarea celulelor. În aceste condiţii experimentale apar deseori unele structuri cristaline intramitocondriale similare cu cele observate în unele miopatii umane. Prezenţa unor mari cantităţi de creatin-kinază în aceste incluziuni a fost evidenţiată prin metode imunochimice.

BCU IAŞI - UNIVERSITY LIBRARY

VII.4 ATP-AZELE ŞI INTERMEDIARII FOSFORILAŢI

După cum s-a arătat mai sus, ATP-azele de tip P sunt acele ATP-aze care îndeplinesc rol transportor pentru calciu, protoni, sodiu, potasiu etc. *Pedersen* şi *Carofoli* includ în această grupă ***Na^+/K^+-ATP-aza*** sau pompa de sodiu, ***Ca^{2+}-ATP-aza***, ***H^+/K^+-ATP-aza*** din tubul digestiv, pompa de potasiu de la *Escherichia coli* etc. Toate aceste „pompe" au mase moleculare cuprinse între 70 şi 120 kDa şi conţin situsuri de legare a ATP-ului, respectiv situsuri de fosforilare. Doar Na^+/K^+-ATP-aza conţine o catenă suplimentară cu o masă moleculară de 55 kDa al cărei rol nu este încă elucidat. Toate aceste ATP-aze prezintă o proprietate comună, aceea de a fi inhibate de vanadat, acesta fiind considerat un analog al fosfatului.

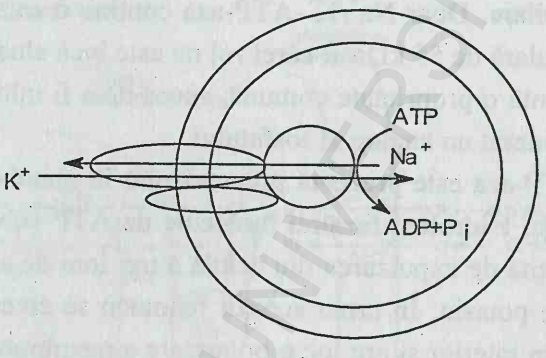
Na^+/K^+-ATP-aza este prezentă preponderent în membrana celulară din ţesuturile animale. Hidroliza fiecărei molecule de ATP sub acţiunea acestei enzime este însoţită de expulzarea din celulă a trei ioni de sodiu şi pătrunderea a doi ioni de potasiu. În urma acestui fenomen se creează un deficit de sarcini pozitive în interior şi are loc o polarizare a membranei celulare (pozitivă în exterior şi negativă în interior). În vederea menţinerii acestei polarizări se realizează un consum energetic foarte mare. Se admite în prezent că celulele animale consumă aproximativ o treime din cantitatea de ATP de care dispune în acest scop. Valoarea potenţialului rezultat este foarte diferită de la un ţesut la altul, fiind cuprinsă între –20 şi –150 mV şi este influenţată şi de fenomenele secundare ce însoţesc pompa de sodiu:

- pierderea ionilor de potasiu cauzată de diferenţa mare de concentraţie de o parte şi de alta a membranei. Concomitent are loc şi o oarecare pierdere a ionilor de sodiu, dar aceasta este nesemnificativă;
- migrarea ionilor Cl^- faţă de care membranele multor celule sunt permeabile;
- funcţionarea diferitelor sisteme de transport activ. De exemplu, intrarea moleculelor de glucoză este însoţită de intrarea ionilor de sodiu.

Rolul pompei de sodiu în menţinerea presiunii osmotice intracelulare este considerabil. Expulzând ionii de sodiu, Na^+/K^+-ATP-aza împiedică creşterea exagerată a presiunii osmotice interne, iar surplusul de potenţial creat împiedică traversarea membranei de către ionii de Cl^-. Această funcţie a

Na^+/K^+-ATP-azei poate fi evidențiată cu ajutorul unui inhibitor specific - ***uabaina.***

Studii referitoare la ATP-aza Na^+, K^+- dependentă au fost efectuate prima dată asupra enzimei din membrana eritrocitară. Aceasta poate fi ușor solubilizată cu un detergent adecvat după care se poate purifica până la un grad de puritate convenabil. După purificare, Na^+, K^+- ATP-aza poate fi inclusă într-o veziculă artificială agitând soluția enzimatică în amestec de fosfolipide și în prezență de ATP și clorură de sodiu:



Hidroliza enzimatică a ATP-ului înglobat în aceste vezicule artificiale se poate produce numai atunci când mediul exterior conține ioni de potasiu. Veziculele conțin clorură de potasiu, ADP și anioni fosfat. S-a demonstrat că, în aceste condiții, transformările sunt reversibile, având loc sinteza de ATP însoțită de eliminarea ionilor de potasiu cu condiția ca mediul exterior să conțină ioni de sodiu. Mult timp s-a crezut că activitatea acestei pompe este reglată prin modificarea concentrației intracelulare de Na^+ (*Brodie, C. et al.* – 1989). Se pare însă că fenomenele sunt mult mai complexe deoarece Na^+, K^+-ATP-aza din celulele întregi este inhibată de o serie de inhibitori ai fosfoprotein-fosfatazei. Aceasta înseamnă că pompa de Na^+/K^+ este inhibată prin fosforilare (*Aperia, A. et al. – 1990*). Pentru celulă, reglarea activității Na^+, K^+- ATP-azei prin fosforilare/defosforilare reprezintă o modalitate de control al consumului energetic necesar funcționării sale la parametrii ceruți de condițiile fiziologice la un moment dat. studiile efectuate de *Bertorello, A. N. și colab.* (1991) au confirmat această ipoteză privind reglarea prin fosforilare și defosforilare, reacții realizate de către ***protein-kinaza C*** și respectiv ***protein-kinaza AMP_c- dependentă.***

Na^+, K^+- ATP-aza are molecula formată din două subunități fiind de forma $\alpha\beta$ şi poate oscila între două stări conformaționale. În una din aceste stări ionii de Na^+ sunt legați la suprafața internă a membranei. După fosforilarea enzimei prin utilizarea ATP-ului în calitate de donor de radicali fosfat, enzima trece în cealaltă stare conformațională, fenomen ce are drept consecință eliberarea ionilor de sodiu spre exterior şi legarea a doi ioni de potasiu (fig. 147).

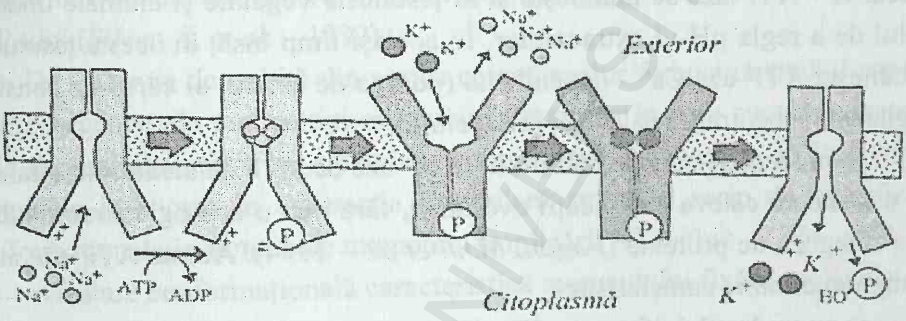


Fig. 147. Mecanismul de acțiune al Na^+, K^+- ATP-azei (Eakle, K. A. et al. – 1995)

Revenirea la prima stare conformațională se face prin scindarea hidrolitică a radicalului fosfat şi eliberarea în interior a ionilor de potasiu. Altfel spus, trecerea Na^+, K^+- ATP-azei dintr-o formă conformațională (cea defosforilată) în alta (fosforilată) are loc sub acțiunea unei kinaze specifice şi se realizează numai în prezența ionilor de sodiu, iar trecerea inversă se face prin defosforilare şi este dictată de prezența ionilor de potasiu. S-a demonstrat experimental că între cele două forme conformaționale extreme, ionii celor două metale alcaline sunt incluşi profund în structura moleculei enzimatice şi orice modificare conformațională transformă un situs cu o afinitate mare față de unul din cei doi ioni într-un situs cu afinitate scăzută. Aceasta înseamnă că prima modificare conformațională (realizată prin fosforilare) conduce la o scădere a afinității față de ionii de Na^+, iar cea de-a doua determină diminuarea afinității față de ionii de K^+.

În prezent se consideră că toate ATP-azele de tip P, adică cele ce funcționează prin formarea unui intermediar fosforilat, prezintă o structură asemănătoare. Tipul ancestral este probabil pompa de potasiu întâlnită la proca-

riote, cea mai bine studiată fiind cea de la colibacil. Aceasta se leagă de ATP-aza ce elimină din celulă ionii unor metale grele cum ar fi cei de cadmiu şi cupru. Aceste enzime sunt codificate de plasmide şi se întâlnesc la tulpinile microbiene rezistente la metalele respective.

La eucariotele inferioare cum ar fi levurile, există o pompă de protoni (H^+- ATP-aza) ce aparţine aceluiaşi tip structural şi care are rolul de a crea un gradient de pH ($\Delta pH = 2,5$) şi un potenţial electric, ambii fiind necesari celulei pentru a îngloba diverşi ioni şi substanţe ionizate cu masă moleculară mică. H^+- ATP-aza se întâlneşte şi în ţesuturile vegetale şi animale unde are rolul de a regla pH-ul extracelular. În acelaşi timp însă, în aceste ţesuturi se întâlneşte ATP-aza Ca^{2+}- dependentă (pompa de calciu) al cărei rol constă în reglarea concentraţiei calciului intracelular.

În prezent se cunosc mai multe ATP-aze de tip P ce alcătuiesc o familie de enzime cu câteva ramificaţii evolutive, fără nici o analogie structurală cu alte categorii de proteine (*Fagan, M. J. et al.* – 1994). Aceste ATP-aze au în comun mai multe caracteristici:

a) au moleculele formate din câte o catenă polipeptidică cu masa moleculară mai mare de 100 kDa şi conţin cel puţin un situs de legare a ATP-ului şi unul de hidroliză a acestui nucleotid. Unele ATP-aze din acest grup au molecula formată din câteva subunităţi din care una este de tip catalitic. Din punct de vedere structural, aceste enzime conţin trei domenii succesive care sunt localizate întotdeauna în aceeaşi ordine;

b) transformările catalizate de aceste enzime conţin şi o etapă de formare a unui intermediar fosforilat la nivelul unui rest de acid aspartic, enzima putând exista cel puţin sub două forme conformaţionale notate convenţional E_1 şi respectiv E_2. Anionii vanadat inhibă ATP-azele de tip P în concentraţii foarte mici, de ordinul micromolilor;

c) primul domeniu conţine câteva secvenţe analoage relativ mari, o buclă şi o secvenţă tetrapeptidică caracteristică (– *Thr – Gly – Glu – Ser* –). Acest domeniu este alcătuit din patru fragmente α-helicoidale transmembranare şi 250 – 420 resturi de aminoacizi. În cazul ATP-azei Na^+K^+ – dependente acest domeniu leagă specific uabaina;

d) al doilea domeniu conţine 250 – 450 resturi de aminoacizi. El este localizat în citoplasmă, are caracter hidrofil şi conţine centrul activ al enzimei cu restul său de acid aspartic ce poate fi fosforilat;

e) ultimul domeniu conține un număr variabil de aminoacizi, iar la enzimele din eucariote el include un număr de patru fragmente α–helicoidale transmembranare în timp ce pentru cele din procariote acest domeniu este mult mai mic, conținând cel mult 100 de resturi de aminoacizi şi doar două fragmente α-helicoidale.

O ATP-ază bacteriană de tip P foarte bine studiată este cea din *Staphylococcus aureus* care conferă acestui microorganism rezistență la cadmiu. Molecula sa conține 727 resturi de aminoacizi. Expulzarea ionilor de cadmiu din celulă are loc cu consum energetic, fiind însoțită de hidroliza ATP-ului (*Silver, S. et al.* – 1992).

De o atenție deosebită din partea cercetătorilor se bucură studiul aspectelor energetice ale contracției musculare, fenomen în care sunt implicate o serie de proteine specifice şi enzime cu activitate ATP-azică. În linii mari, proteinele implicate în contracția musculară suferă o serie de modificări conformaționale în funcție de momentul implicării ATP-ului:

– o stare conformațională caracteristică momentului fixării moleculei de ATP;

– trecerea într-o altă stare conformațională după finalizarea hidrolizei ATP-ului;

– existența unei a treia stări conformaționale după îndepărtarea produşilor de hidroliză.

În general, în procesul complex al mobilității sunt implicate doar câteva proteine, cele mai importante fiind miozina, actina, tropomiozina, troponina şi parvalbuminele.

Miozina reprezintă peste 30% din proteinele musculare totale şi peste 65% din totalul proteinelor contractile. Este o proteină oligomeră ce conține şase subunități din care două a câte 200 kDa fiecare sub formă α-helicoidală, înfăşurate una în jurul celeilalte. Alte două subunități au masele moleculare a câte 18 kDa fiecare şi conțin grupe tiolice libere, iar celelalte două subunități au fost notate convențional cu A_1 şi A_2 şi conțin 190 (20,7 kDa) şi, respectiv, 148 (16,5 kDa) resturi de aminoacizi. Miozina extrasă din țesutul muscular prin tratare cu soluții saline concentrate are tendința de a se asocia în fibrile.

Un aspect deosebit de important din punct de vedere biochimic şi fiziologic îl constituie faptul că miozina poate fi considerată ca fiind o ATP-ază specială. Activitatea sa este foarte scăzută în stare pură, în schimb creşte puternic atunci când se află sub formă asociată cu ***actina*** cu care formează

complexul numit ***actomiozină***. Complexul actomiozinic poate fi obținut fie prin izolare directă din țesutul muscular, fie prin reconstituire plecând de la actina și miozina în stare pură.

Complexul actomiozinic este format din trei molecule de miozină și una de actină F și prezintă activitate ATP-azică în prezența ionilor de Mg^{2+} sau Ca^{2+}. Cu toate acestea, ATP-ul determină disocierea actomiozinei care se reasociază numai atunci când întreaga cantitate de ATP a fost hidrolizată.

Tropomiozina are capacitatea de a interacționa cu filamentele de actină F inhibând activitatea ATP-azică a miozinei. Condițiile intracelulare fiziologic normale favorizează polimerizarea actinei cu formarea filamentelor de actină F, deși aproape jumătate din cantitatea totală de actină se află sub formă de monomer (actina G). Se pare însă că procesul de polimerizare a actinei este supus unui control foarte complex în care sunt implicate nu mai puțin de 30 de proteine dintre care ***profilina*** se găsește în cantitatea cea mai mare, deși tropomiozina joacă rolul central. Ea inhibă polimerizarea actinei, dar filamentele de actină odată formate sunt stabilizate de către tropomiozină (*Fraser, I. D. et al.* – 1995).

Troponina este o proteină contractilă ce are molecula formată din trei subunități: ***troponina TN-T*** cu masa moleculară de 37 kDa ce conține un situs de legare a tropomiozinei și joacă un rol plastic, ***troponina TN-I*** cu masa moleculară de 24 kDa care inhibă activitatea ATP-azică interpunându-se între actină și miozină și respectiv ***troponina TN-C*** cu masa moleculară de 18 kDa capabilă să lege ionii de calciu. Troponina C joacă un rol extrem de important în declanșarea contracției musculare datorită capacității sale de a lega ionii de calciu. De-a lungul unui filament, o moleculă de troponină corespunde la șapte monomeri de actină.

Parvalbuminele sunt proteine cu masa moleculară de 12 kDa cu caracter acid ce conțin două situsuri de legare a calciului. La vertebratele inferioare lipsește troponina C, funcțiile acesteia fiind îndeplinite de parvalbumine. Parvalbuminele se întâlnesc însă și în țesutul muscular al mamiferelor.

În mușchiul aflat în repaus, concentrația calciului este destul de scăzută (de ordinul a 10^{-7} M), în schimb magneziul se află în cantități crescute. În timpul contracției musculare, concentrația calciului crește de peste 100 de ori, ionii acestui metal înlocuindu-i pe cei de magneziu. Caracteristic pentru parvalbumine este absența resturilor de cisteină, tirozină și triptofan. De ase-

menea, nu prezintă bandă de absorbție la 280 nm caracteristică pentru multe alte proteine.

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

VIII REGLAREA ACTIVITĂȚII ENZIMELOR

Una din principalele caracteristici ale metabolismului substanțelor și energiei o constituie capacitatea sa de autoreglare, prin care toți parametrii biochimici și fiziologici sunt menținuți între limite normale. Această caracteristică a metabolismului este asigurată, printre altele, de mecanismele prin care se realizează reglarea activității enzimatice. Aceste mecanisme sunt extrem de diverse, iar în funcție de modul de realizare ele pot fi grupate astfel:

a) reglarea biosintezei *de novo* a enzimelor;

b) reglarea activității catalitice prin acțiunea modulatorilor;

c) reglarea conversiei zimogenilor în enzime active în funcție de necesitățile de moment ale celulei, țesutului, organului și/sau organismului.

VIII.1 ENZIME ALOSTERICE

Inițial, termenul de ***alosterie*** a fost utilizat pentru a desemna orice modificare conformațională a proteinelor intervenită ca urmare a interacțiunii acestora cu orice compus care se leagă în afara centrului activ al enzimelor și respectiv în afara centrului de legare a metabolitului transportat în cazul proteinelor de transport. Fenomenul de alosterie se referă, de exemplu, și la influența 2,3-difosfogliceratului asupra proprietății hemoglobinei, această acțiune având loc la nivelul unui situs distinct de cele de legare a oxigenului. Prin extrapolare această definiție este extinsă și asupra **efectelor cooperative**: modificarea indusă în molecula hemoglobinei în urma fixării primelor molecule de oxigen este considerată, de asemenea, alosterie.

Un efect cooperativ nu poate exista decât dacă proteina posedă mai multe situsuri de legare pentru același compus, această situație întâlnindu-se de obicei la proteinele oligomere, deci cele cu structură cuaternară. La baza acestui efect stă fenomenul prin care, în momentul când un efector se leagă la nivelul unui situs de legare disponibil în una din subunități, aceasta tinde să-și modifice conformația, modificarea respectivă transmițându-se și celorlalți protomeri. Studiind efectele alosterice, *Monod et al.* (1965) consideră că orice modificare conformațională survenită la una din subunități se transmite

tuturor celorlalte în aşa fel încât să fie păstrată simetria moleculei. Are loc o modificare a întregului sistem pe baza binecunoscutului principiu *„totul sau nimic"*. Studiul enzimelor alosterice a pus în evidenţă următoarele caracteristici comune:

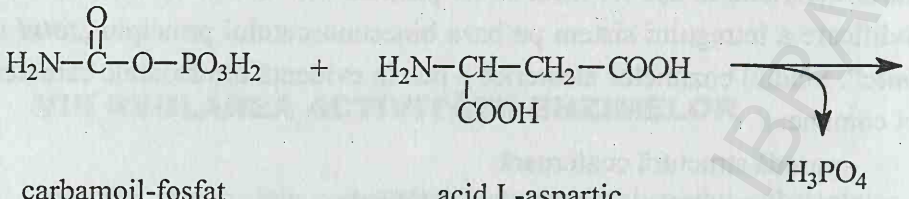
- posedă structură cuaternară;
- au o comportare cinetică nemichaeliană;
- suferă modificări conformaţionale fără pierderea activităţii catalitice;
- joacă, în general, o funcţie reglatoare, în special în secvenţele biosintetice.

Contrar enzimelor ce respectă cinetica michaeliană şi a căror funcţionare poate fi descrisă prin doi parametri cinetici de bază (K_M şi V_{max}), enzimele alosterice se comportă ca şi cum cel puţin unul dintre cei doi parametri poate varia în funcţie de natura şi modul de legare a efectorului. În funcţie de comportamentul enzimei în prezenţa efectorului, există două grupe de enzime alosterice:

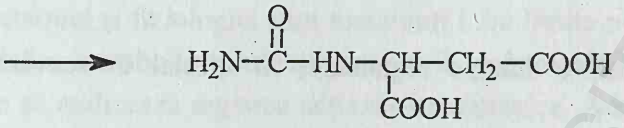
- enzime aparţinând **sistemului K** la care se observă o variaţie a afinităţii faţă de un compus dat, numit efector, în funcţie de concentraţia acestuia; dacă enzima oscilează între două forme conformaţionale **R** şi **T** (vezi VI.8), formele T nu prezintă aceeaşi afinitate pentru efector care poate fi un substrat, un inhibitor competitiv sau orice alt produs;
- enzime aparţinând **sistemului V** care trec dintr-o formă în alta fără modificarea afinităţii pentru efector, dar îşi modifică valoarea parametrului V_{max}.

După cum s-a mai arătat (II.3.4) enzimele alosterice sunt, în principal, enzimele cheie, cele ce catalizează primele etape ale unei secvenţe metabolice. În aceste situaţii, efectorul este reprezentat de cele mai multe ori de produsul final al secvenţei metabolice date care inhibă enzima alosterică printr-un mecanism de tip *feed back* (retroinhibiţie).

Una din primele enzime studiate sub aspectul mecanismului retro- inhibiţiei a fost ***aspartat-transcarbamilaza (carbamoilfosfat : L-aspartat-carbamoil-transferaza***, EC 2.1.3.2) din *Escheriachia coli* care catalizează reacţia de condensare a acidului aspartic cu carbamoilfosfatul:



carbamoil-fosfat + acid L-aspartic → H_3PO_4



carbamoil-aspartat

Această reacție reprezintă prima etapă a unei secvențe metabolice prin care se sintetizează nucleotidele pirimidinice. Dacă se modifică concentrația aspartatului păstrând constanți ceilalți parametri se obține o curbă nemichaeliană, ceea ce sugerează că fixarea substratului la enzimă prezintă un efect clar de cooperativitate. Repetând experiența cu un mediu de incubare conținând **CTP** se observă inhibiția activității catalitice, iar dacă se introduce o anumită cantitate de AMP sau ATP are loc activarea enzimei. L-izoleucina și ATP-ul sunt efectori negativ și respectiv pozitiv. Dacă se realizează un tratament cu p-clormercurizobenzoat (pCMB, reactiv specific tiolilor) enzima capătă un comportament michaelian.

Se crede că în forma sa nativă, aspartat-transcarbamilaza nu își dezvoltă *in vivo* capacitatea catalitică maximă, existând o oarecare inhibiție din partea citidintrifosfatului și o anumită activare în prezența adenozintri-fosfatului. Activitatea catalitică este deci modulată prin semnale chimice ceea ce permite reglarea acesteia la nivelul cerut în celulă. În acest caz CTP-ul, care este produsul final al secvenței metabolice, inhibă activitatea aspartat-transcarbamilazei prin mecanism *feed back*. Biosinteza ATP-ului, care în acest caz este un activator al enzimei, nu este influențată de aspartat-transcarbamilază.

Biosinteza bazelor azotate purinice se realizează pe căi independente. De aceea, este ușor de imaginat utilitatea fiziologică a efectului ATP-ului. Acest nucleozid trifosforilat, împreună cu CTP-ul, GTP-ul și UTP-ul, servește drept precursor în biosinteza moleculelor de ARN, în afară de rolul energe-

BCU Cluj / UNIVERSITY LIBRARY

tic arhicunoscut. Cum însă bazele azotate purinice şi pirimidinice sunt sintetizate pe căi diferite, una din problemele mai dificile întîmpinate de celulă o constituie echilibrarea acestor căi biosintetice. ATP-ul are un efect antagonist CTP-ului semnalizând că producţia de purine este în avans faţă de nivelul bazelor pirimidinice şi că trebuie accelerată biosinteza acestora din urmă. Concentraţia CTP-ului influenţează procesul în sens invers.

Molecula aspartat-transcarbamilazei are o structură cuaternară alcătuită din 12 subunităţi, fiind de tipul C_6R_6. Subunităţile de tip **C (catalitice)** au masa moleculară de 33 kDa în timp ce subunităţile de tip **R (reglatoare)** au masele moleculare de câte 17 kDa. Ansamblul enzimatic activ va avea deci o masă moleculară de 300 kDa. Prin disocierea parţială a acestei structuri complexe se eliberează două fragmente de tip C_3 şi trei fragmente de tip R_2. Protomerii catalitici (subunităţile de tip C) conţin câte două domenii: unul specializat în recunoaşterea unuia din substrate (acidul aspartic), iar celălalt cu o afinitate mare faţă de radicalul ortofosfat al celuilalt substrat (carbamoilfosfatul). La rândul lor, subunităţile reglatoare (R) contactează în zona lor C-terminală subunităţile catalitice (C) într-o zonă ce conţine un ion de zinc, iar la cealaltă extremitate conţin un situs de legare pentru CTP. Situsurile catalitice sunt formate de câte două subunităţi C, ceea ce înseamnă că fragmentul C_3 va avea trei centri activi, iar complexul enzimatic nativ va prezenta şase asemenea situsuri.

În absenţa oricărui substrat sau efector, aspartat-transcarbamilaza adoptă o structură compactă numită **forma T** (unii autori o denumesc **forma Te**), iar în prezenţa N-fosfoacetil-L-aspartatului ea trece într-o formă mai destinsă, numită **forma R (Re)**, (aceste prescurtări derivă de la „*tense*" şi respectiv „*relaxed*"). Dimerii R_2 sunt localizaţi spre exteriorul moleculei formând trei punţi între fragmentele C_3. La fiecare punct de contact între subunităţile C şi R se află câte un ion de zinc care pare a fi esenţial pentru menţinerea structurii cuaternare. Întregul edificiu poate adopta două stări conformaţionale extreme, tinzând spre o stare sau spre cealaltă sub acţiunea diferiţilor efectori, substrate sau nucleotide. Fixarea substratelor declanşează un efect cooperativ similar cu cel observat în cazul hemoglobinei. Trimerii catalitici (C_3) suferă o uşoară rotaţie (cu 15°) unul faţă de celălalt în jurul axei întregii molecule, ceea ce determină o îndepărtare a lor cu 1,2 nm. Această rotire determină o uşoară „umflare" a întregului edificiu cuaternar ce corespunde unor modificări la nivelul structurii terţiare. Toate aceste fenomene au drept urmare fap-

tul că subunitățile catalitice își modifică comportamentul față de domeniile C-terminale ale subunităților reglatoare adiacente. Are loc deci un **efect cooperativ** pozitiv în sensul că primele molecule de substrat provoacă o modificare conformațională care mărește afinitatea enzimei pentru următoarele molecule de substrat. În acest proces, valoarea constantei K_M scade considerabil (de la 90 mM în momentul legării primei molecule de substrat la 7 mM, conform datelor publicate de *Lipscomp et al.*). Acest efect exercitat asupra centrului activ poartă numele de **efect homotropic**.

Interacțiunea moleculelor de CTP cu formele R ale enzimei este, de asemenea, de tip cooperativ, dar negativă. Aceasta înseamnă că prima moleculă care se leagă de enzimă diminuează afinitatea acesteia față de următoarele molecule de CTP. În această situație vorbim de un **efect heterotrop** deoarece el se manifestă în afara situsului catalitic.

Există numeroase enzime alosterice implicate în toate secvențele metabolice, atât din căile de biosinteză cât și din cele de degradare. Bine studiate sub acest aspect sunt **treonin-dezaminaza, glicogen-fosforilaza, fosfofructo-kinaza, gliceraldehid-3-fosfat-dehidrogenaza, piruvat-kinaza** etc.

Reglarea activității enzimelor prin inhibiție nu se realizează însă numai la nivelul enzimelor alosterice și numai prin retroinhibiție. În organismele vii există numeroși inhibitori naturali ai enzimelor cu rol în reglarea activității acestora. De exemplu, **nexinele** sunt inhibitori ai proteinazelor ce sunt eliberate în mediu de către fibroblaștii umani în cultură. Încă din 1985 se cunoșteau trei nexine : **PN-I, PN-II** și **PN-III** (PN derivă de la *„protease nexin"*). Principalele caracteristici ale nexinelor sunt:

- inhibă serin-proteinazele;
- fiecare nexină acționează specific asupra unei proteinaze, mai rar asupra mai multor enzime; de exemplu PN-I inhibă trombina, tripsina, plasmina, urokinaza și în general proteinazele care prezintă afinitate față de legăturile peptidice ale argininei;
- nexina este clivată de către proteinaza țintă când pierde un fragment din molecula sa. Restul moleculei rămâne legat la centrul activ al enzimei printr-o legătură covalentă cu formarea unui complex proteinază-nexină inactiv;
- complexul nexină-proteinază este adsorbit de către celulele ce produc nexina, fixarea având loc la nivelul inhibitorului;

- în final, acest complex este transportat în interiorul celulei unde este distrus.

VIII.2 REGLAREA ACTIVITĂȚII ENZIMATICE PRIN CONVERSIA ZIMOGENILOR ÎN ENZIME ACTIVE

După cum s-a arătat mai sus (vezi VI.8) unele enzime se sintetizează sub forma unor precursori inactivi. Aceştia sunt apoi transportaţi prin diferite mecanisme la organul/țesutul în care vor acționa, fiind convertiți în enzimele active corespunzătoare în urma unor modificări structurale cauzate cel mai adesea de scindări hidrolitice specifice. Aceste fenomene stau la baza unor mecanisme de reglare şi control foarte precise, transformarea zimogenului în enzima activă realizându-se în strânsă interdependență cu necesitățile concrete de moment ale organismului, atât la animale cât şi la plante sau microorganisme. Deseori, aceste mecanisme de transformare a zimogenilor sunt corelate cu alte mecanisme de reglare şi control în sensul că o activitate crescută a unei enzime date determină creşterea concentrației produsului final al secvenței metabolice în care aceasta este implicată. Prin retroinhibiție activitatea acesteia este diminuată şi, implicit, se micşorează viteza cu care precursorul ei inactiv se transformă în enzima activă. Atunci când produsul final este consumat în alte căi metabolice, enzima alosterică este dezinhibată, fiind accelerată totodată şi viteza de formare a ei din zimogenul corespunzător.

Zimogenele cele mai bine studiate sub aspectul mecanismului conversiei lor în enzime active sunt proenzimele unor proteinaze (pepsinogenul, plasminogenul, tripsinogenul, chimotripsinogenul, prorenina) dar şi alte zimogene.

VIII.3 REGLAREA BIOSINTEZEI ENZIMELOR

Fiind proteine, enzimele sunt sintetizate la nivel ribozomal prin acelaşi mecanism ca şi în cazul proteinelor structurale. Reglarea biosintezei enzimelor este caracteristică tuturor organismelor vii şi reprezintă una din principalele modalități de reglare metabolică. Ca şi în cazul celorlalte proteine, reglarea biosintezei enzimelor se realizează prin două mecanisme antagonice: **inducția şi represia.**

VIII.3.1 Inducția biosintezei enzimelor

Inducția este fenomenul prin care se declanşează sau se accelerează biosinteza unei enzime date sub acțiunea unor substanțe numite **inductori**. Din punctul de vedere al reglării biosintezei lor prin inducție, enzimele se împart în două grupe principale:

- ***enzime constitutive*** a căror viteză de biosinteză este constantă, nefiind influențată de prezența inductorilor. Ele intră în mod constant în constituția celulei, catalizând procesele metabolice de bază din organismele vii;

- ***enzime inductibile*** care sunt sintetizate continuu, cu viteză variabilă, existînd momente când biosinteza lor este complet stopată. Procesul biosintetic are loc în acest caz atunci când necesitățile metabolice o cer şi este declanşat de pătrunderea în celulă a unor substanțe cu acțiune specifică (inductori) care pot fi deseori substrate ale enzimelor induse.

Deşi mecanismul inducției enzimatice se poate întâlni şi la organismele superioare, cel mai bine studiate sunt enzimele inductibile microbiene. La microorganisme se întâlnesc cele mai multe enzime inductibile, în special în cazul tulpinilor microbiene ce pot utiliza drept sursă de carbon şi energie substrate diferite.

Una din enzimele inductibile microbiene ce a fost intens studiată este **β-galactozidaza** (**β-D-galactozid-galactohidrolaza**, EC 3.2.1.23) din *E. coli* ce clivează resturile de β-D-galactoză din galactozide, în particular hidroliza lactozei cu formare de β-D-galactoză şi α-D-glucoză. Procesul de biosinteză al acestei enzime este deosebit de lent în celulele de *E. coli* cultivate pe medii cu glucoză. Biosinteza β-galactozidazei este însă puternic intensificată în celulele cultivate pe medii cu lactoză, acest dizaharid îndeplinind rol de inductor, pe lângă rolul de sursă de carbon şi energie.

Reglarea biosintezei prin inducție se întâlneşte îndeosebi în cazul enzimelor implicate în secvențe catabolice când asigură asimilarea substratelor şi integrarea lor în metabolismul celular.

VIII.3.2 Represia biosintezei enzimelor

Represia este fenomenul prin care se realizează diminuarea sau întreruperea biosintezei unei enzime date sub acțiunea unor substanțe cu mase moleculare mici. Represia poate fi de două tipuri, în funcție de natura speciilor moleculare care o determină:

- ***represie prin produsul final*** care are loc atunci când acumularea unor cantități mari ale produsului final al unei secvențe metabolice determină diminuarea vitezei cu care sunt sintetizate enzimele implicate în secvența respectivă. Acest tip de represie nu trebuie confundat cu inhibiția prin *feed back* (retroinhibiția) deoarece în acest din urmă caz este afectată doar enzima ce catalizează prima etapă a secvenței metabolice date, iar aceasta se modifică doar calitativ (fiind inhibată), nu și cantitativ;
- ***represia catabolică*** determinată de produșii intermediari de degradare.

Diferența între cele două tipuri constă în faptul că în timp ce represia prin produsul final este specifică enzimelor implicate în secvențele anabolice, represia catabolică se întâlnește preponderent la enzimele implicate în diferite procese de degradare catabolică.

VIII.3.3 Mecanismul reglării biosintezei enzimelor

Reglarea biosintezei enzimelor prin inducție și represie se realizează la nivelul transcrierii, adică la nivelul biosintezei ARN-ului informațional pe o matriță de ADN (fig. 148 și 149).

La baza reglării biosintezei proteinelor stă **operonul** format din mai multe **gene structurale (cistroni)** care controlează prin intermediul ARN-ului mesager biosinteza anumitor proteine. Aceste gene sunt vecine și dispuse în aceeași succesiune în care se realizează secvența metabolică sub acțiunea enzimelor a căror biosinteză o controlează. În aceeași zonă a moleculei de ADN este localizată și **gena operatoare** care controlează cuplarea și decuplarea genelor structurale. La rândul ei, gena operatoare se află sub controlul unei **gene reglatoare** ce poate fi localizată într-o cu totul altă zonă, uneori chiar în alt cromozom. Ea își exercită efectul prin intermediul unui **represor** care este o substanță de natură proteică.

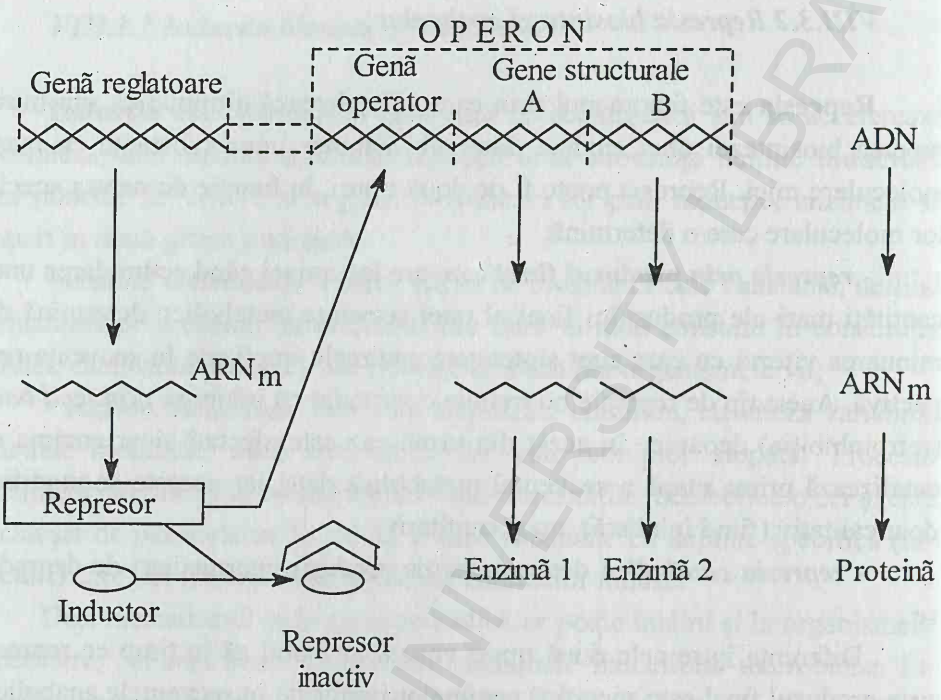


Fig. 148. Reprezentarea schematică a reglării biosintezei enzimelor prin inducție (Artenie Vl., 1991)

În absența **inductorului**, biosinteza enzimelor este blocată deoarece represorul liber acționează asupra genei operatoare pe care o blochează, împiedicând transcierea operonului. Când în celulă pătrunde inductorul, acesta interacționează cu represorul pe care îl inactivează și, drept urmare, gena operatoare își poate exercita rolul cuplând genele structurale. Acestea determină la rândul lor realizarea transcrierii și implicit biosinteza enzimelor.

Represia biosintezei enzimelor se bazează pe afinitatea represorului față de gena operatoare. Represorul poate interacționa cu un metabolit dat numit **corepresor** activându-se. Calitatea de corepresor poate fi îndeplinită și de produsul final al unei secvențe metabolice realizată de enzimele supuse reglării. Sub forma sa activă, represorul blochează gena operatoare și în felul acesta se întrerupe transcrierea genelor structurale deci și biosinteza enzimelor. Când corepresorul dispare, represorul se inactivează, nemaiputând acționa asupra genei operatoare, caz în care biosinteza enzimelor este declanșată ca urmare a transcrierii genei structurale sub acțiunea genei operatoare.

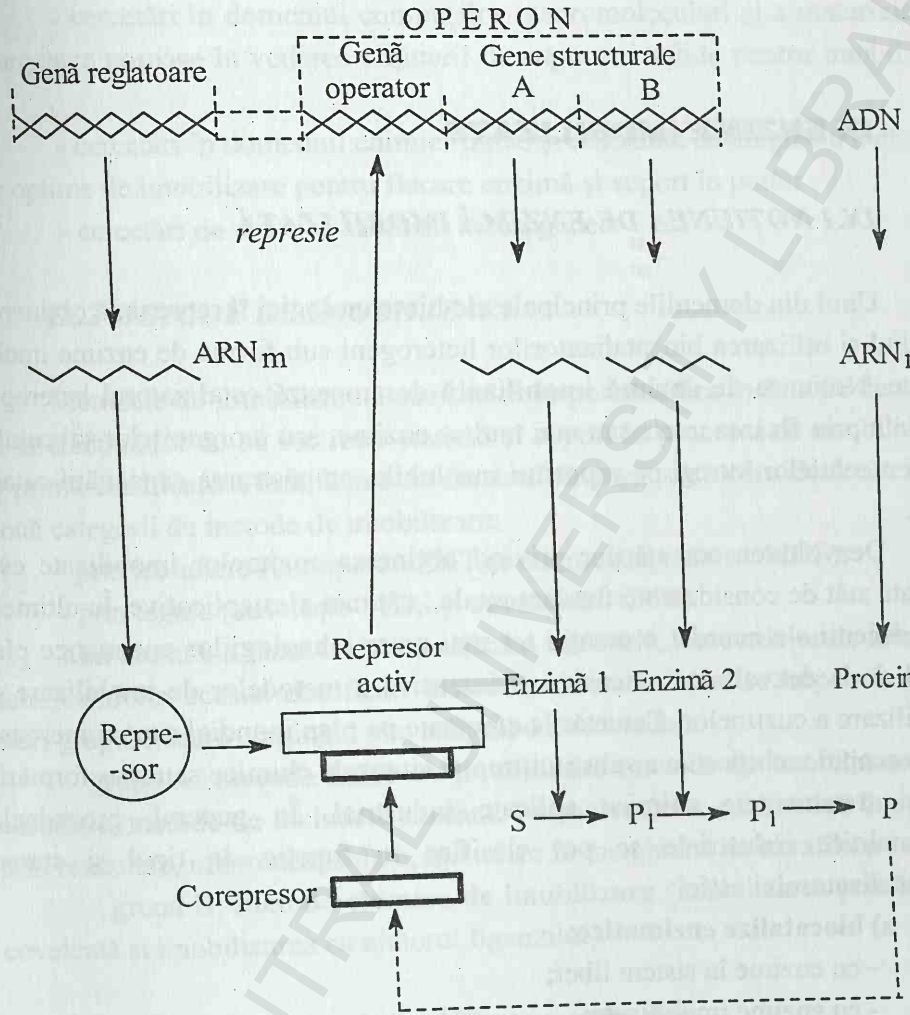


Fig. 149. Reprezentarea schematică a reglării biosintezei enzimelor prin represie (Artenie Vl., 1991)

Reglarea biosintezei enzimelor la animale pe calea inducției și represiei este mai complicată deoarece ea se realizează nu numai sub influența substratelor și produșilor de reacție (cum se întâmplă de exemplu în cazul **triptofanului/triptofanpirolazei**), dar și sub acțiunea hormonilor. De exemplu biosinteza **glucozo-6-fosfatazei** în ficat este indusă de **tiroxină** și **cortizon** și represată de **insulină**.

BCU CLUJ CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

IX ENZIME IMOBILIZATE

IX.1 NOȚIUNEA DE ENZIMĂ IMOBILIZATĂ

Unul din domeniile principale ale biotehnologiei îl reprezintă obținerea, studiul şi utilizarea biocatalizatorilor heterogeni sub formă de enzime imobilizate. Noțiunea de **enzimă imobilizată** desemnează catalizatorul heterogen obținut prin fixarea uneia sau mai multor enzime, sau a organitelor subcelulare şi a celulelor întregi pe suporturi insolubile, cu păstrarea capacității catalitice.

Dezvoltarea cercetărilor privind obținerea enzimelor imobilizate este dictată atât de considerente fundamentale, cât mai ales aplicative. În ultimele 2-3 decenii s-a acordat o atenție tot mai mare tehnologiilor enzimatice plecând de la dezvoltarea extensivă şi intensivă a metodelor de imobilizare şi stabilizare a enzimelor. Cercetările efectuate pe plan mondial sunt numeroase şi au scopul ambițios de a substitui treptat sintezele chimice sau transformările şi tratamentele chimice aplicate industrial. În general, procedeele biocatalitice industriale se pot clasifica în funcție de tipul şi starea biocatalizatorului astfel:

a) **biocatalize enzimatice**:
- cu enzime în sistem liber;
- cu enzime imobilizate;

b) **biocatalize realizate de celule** :
- cu celule în sistem liber;
- cu celule imobilizate.

Cercetările în acest domeniu întreprinse pe plan mondial au condus la rezultate promițătoare, atât din punct de vedere fundamental cât şi aplicativ. Problema obținerii enzimelor imobilizate cere îmbinarea unor cercetări multidisciplinare cum ar fi:

- cercetări de enzimologie şi biologie moleculară privind studiul structurii şi stabilității enzimelor libere şi imobilizate;

BCU "CAROL I" BUCUREŞTI LIBRARY

- cercetări în domeniul compuşilor macromoleculari şi a materialelor anorganice poroase în vederea obținerii de suporturi solide pentru imobilizare;

- cercetări în domeniul chimiei fizice şi coloidale de alegere a metodelor optime de imobilizare pentru fiecare enzimă şi suport în parte;

- cercetări de cinetica catalizei heterogene.

IX.2 METODE DE IMOBILIZARE

Metodele de imobilizare a enzimelor se pot clasifica în funcție de natura interacțiunilor ce au loc între enzimă şi suport în procesul de imobilizare. O primă clasificare a fost făcută de *Durand G. et al.* care consideră că există două categorii de metode de imobilizare:

- prin includere (entrapare - ENT şi microencapsulare - MEC);

- prin legare (adsorbție- ADS şi covalentă - CVB).

Mai târziu s-a făcut o altă clasificare, rațională, a metodelor de imobilizare. Conform acestei clasificări metodele de imobilizare se împart în două mari grupe, fiecare conținînd alte subgrupe de metode :

- grupa A: **metode fizice de imobilizare** (metode de imobilizare prin adsorbție, metode de includere mecanică a moleculelor enzimatice în suport prin reticulare, microîncapsulare, includere în membrane de ultrafiltrare etc.);

- grupa B: **metode chimice de imobilizare** (imobilizarea prin legare covalentă şi imobilizarea cu ajutorul liganzilor).

IX.2.1 Metode fizice de imobilizare a enzimelor

Metodele de imobilizare prin care enzima se leagă de suport fără formare de legături covalente reprezintă metodele fizice de imobilizare. Acestea la rândul lor se împart în două subgrupe: imobilizarea prin adsorbție şi respectiv includerea mecanică a moleculelor enzimatice în suport (includere în geluri, microîncapsulare etc.).

În cazul adsorbției, enzimele sunt menținute la suprafața suportului datorită interacțiunilor electrostatice, a legăturilor hidrofobe, punților de hidrogen etc. Includerea mecanică în suport presupune utilizarea unor geluri reticulate, microcapsule, fibre, membrane de ultrafiltrare etc. Deşi metodele fizice de imobilizare a enzimelor sunt, în general, simple, rapide şi eficiente, aria

de aplicabilitate este relativ restrânsă, datorită faptului că menținerea moleculelor de protein-enzimă la suprafața suportului este asigurată de legături relativ slabe, ceea ce face ca să existe pericolul unei eluții parțiale sau chiar totale a enzimelor în cazul utilizării de substrate în soluții de forță ionică superioară.

IX.2.1.1 Imobilizarea enzimelor prin adsorbție

Dintre metodele fizice, imobilizarea prin adsorbție este cel mai des utilizată, reprezentînd cel mai economic procedeu de insolubilizare a enzimelor. Enzimele sunt fixate la suprafața suportului datorită următoarelor tipuri de legături ce intervin în adsorbție:

- ***interacțiuni van der Waals*** - interacțiuni electrostatice între atomi sau molecule cu moment de dipol;

- ***punți de hidrogen*** ce se formează în cazul grupărilor -OH, -COOH, -NH_2;

- ***transfer de sarcină*** - adică toate interacțiunile între substanțe electrofile şi nucleofile;

- ***schimb de ioni.***

Cantitatea de enzimă legată de suport în cazul adsorbției depinde de următorii parametri :

a) ***concentrația proteică*** a soluției enzimatice influent; masa de enzimă fixată creşte proporțional cu concentrația până la o valoare limită când adsorbantul se saturează. Valoarea acesteia este dată de următoarele relații:

$$m = k_1 C^{k_2}$$ izoterma Freundlich

în care:

m - masa legată

C - concentrația la echilibru

k_1, k_2 - constantele de echilibru

sau:

$$m = \frac{k_1 \cdot k_2 \cdot C}{1 + k_2 \cdot C}$$ izoterma Langmuir

BCU IAȘI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Reprezentarea grafică C/m în funcție de C permite obținerea valorilor k_1 și k_2 pentru fiecare imobilizat;

b) ***timpul de contact***: viteza de adsorbție este determinată de caracteristicile fizico-chimice ale adsorbantului și ale proteinei adsorbite (dimensiunile moleculelor și ale particulelor suportului, prezența și natura sarcinilor electrice etc.). În condiții obișnuite, timpul necesar pentru obținerea unui preparat enzimatic imobilizat este, în general, scurt, nedepășind câteva ore;

c) ***temperatura de reacție***: viteza de adsorbție, depinzând de caracteristicile difuzionale ale moleculelor, va crește cu temperatura până la o valoare optimă a acesteia;

d) ***influența pH-ului***: s-a constatat experimental că adsorbția maximă este, de regulă, în vecinătatea punctului izoelectric al enzimei adsorbite.

IX.2.1.2 Imobilizarea enzimelor prin includere în geluri

Simplitatea obținerii, lipsa modificărilor chimice în structura enzimelor într-un interval larg al compoziției și structurii gelului, stabilitatea ridicată a preparatelor enzimatice obținute sunt factori ce determină utilizarea largă a metodei de imobilizare a enzimelor prin includere în geluri.

În ultimul timp s-au propus noi tehnici de includere în geluri și noi tipuri de geluri. De exemplu, polimerizarea în emulsie constând dintr-o fază apoasă (solvent pentru monomer, inițiator și enzimă) și o fază hidrofobă (amestec de toluen și cloroform) permite obținerea unui hidrogel sub formă de particule sferice a căror dimensiune poate fi controlată prin schimbarea condițiilor de polimerizare. În cazul în care emulsia este înghețată înaintea polimerizării se obțin particule poroase cu o suprafață specifică mare.

O răspândire largă, în prezent, o are metoda polimerizării inițiată de radiațiile γ, nefiind nevoie de acțiunea inițiatorilor chimici care pot inactiva enzimele.

În prezent, pentru imobilizarea enzimelor cel mai adesea se folosesc gelurile de poliacrilamidă (fig. 150). Calitățile acestor geluri pot fi îmbunătățite utilizând metoda radiopolimerizării.

Gelurile astfel obținute au o structură poroasă, cu suprafață activă mare, iar elasticitatea crește considerabil dacă polimerizarea are loc în prezența amidonului 5 %, crescând totodată și termostabilitatea enzimei imobilizate.

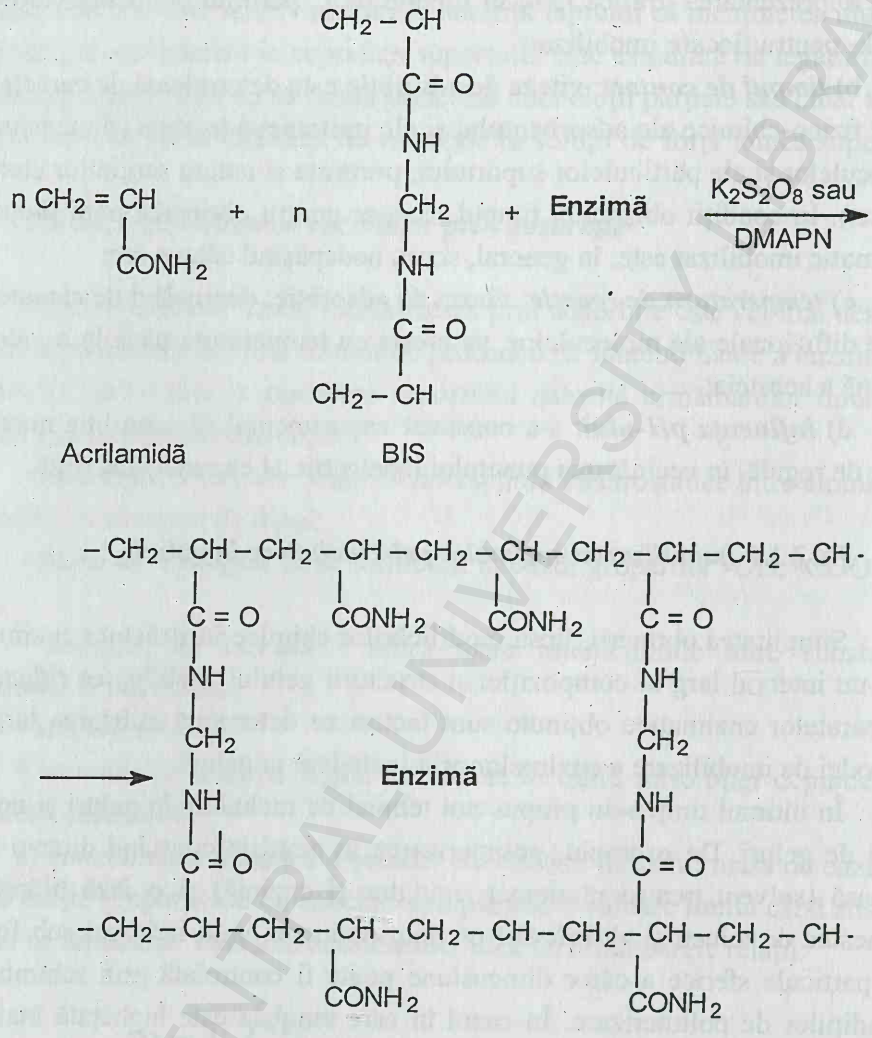


Fig. 150. Reacţiile de copolimerizare ce au loc în timpul imobilizării enzimelor prin includere în gel de poliacrilamidă

IX.2.1.3 Imobilizarea enzimelor prin microîncapsulare

Microîncapsularea este o metodă fizică de imobilizare ce se realizează prin includerea enzimelor într-o microcapsulă formată dintr-o membrană semipermeabilă. Aceasta este impermeabilă pentru protein-enzima din interior şi compuşii macromoleculari externi, însă permite difuzia liberă a

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

compuşilor cu masă moleculară mică, cum ar fi unele substrate şi produşii lor de reacţie (fig. 151).

Drept suport de imobilizare se folosesc atât polimerii naturali cât şi cei sintetici. Obţinerea microcapsulelor sintetice se realizează prin policondensare şi coacervare interfazică sau prin emulsionare dublă. În cazul policondensării interfazice, formarea membranei semipermeabile se face prin reacţii chimice ce au loc la suprafaţa de separare dintre cele două faze (apă-solvent organic), iar în cazul coacervării, aceasta se formează datorită scăderii solubilităţii polimerului la limita dintre faze. Dezavantajul acestor două metode de microîncapsulare constă în faptul că sunt necesare substanţe de umplutură inerte pentru menţinerea presiunii interne în microcapsule şi stabilizarea enzimelor la valori crescute ale pH-ului amestecului.

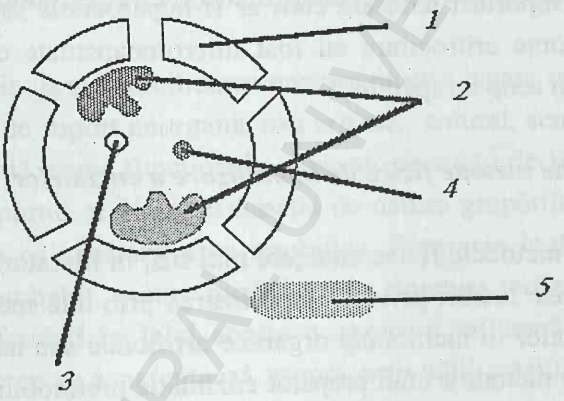


Fig. 151. Schema de funcţionare a enzimelor microîncapsulate: 1 - microcapsulă; 2 - enzimă imobilizată; 3 - substrat cu masă moleculară mică; 4 - produs cu masă moleculară mică; 5- substanţă macromoleculară

Metoda emulsionării duble reprezintă o modificare a primelor două metode de microîncapsulare. Soluţia apoasă de enzimă se emulsionează împreună cu soluţia monomerului într-un solvent organic, apoi suspensia obţinută se emulsionează în faza apoasă cu formare de sfere solide conţinând micropicături din soluţia enzimatică. Prin aceste metode se obţin microcapsule cu diametrul de zecimi până la sutimi de micron. În ceea ce priveşte rolul substanţelor inerte de umplutură, acestea participă la reacţia de polimerizare reticulând macromoleculele polimerului, fapt ce conferă membranei o structură rigidă.

Utilizarea microcapsulelor naturale permite obținerea unor preparate de enzime imobilizate de uz medical. Folosirea enzimelor în scop terapeutic este legată de o serie de afecțiuni, în special congenitale, cauzate de lipsa unor enzime sau activitatea diminuată a acestora. Aceste boli nu pot fi tratate cu mijloace terapeutice clasice şi, în principiu, cedează numai la introducerea enzimei deficitare.

Printre suporturile naturale folosite des la microîncapsularea enzimelor se numără liposomii şi fantomele eritrocitare. Avantajul acestora constă în faptul că odată introduse în organism nu prezintă fenomenul de respingere şi sunt vehiculate de fluxul sanguin la toate organele şi țesuturile. Imobilizarea enzimelor în microcapsule naturale se face relativ uşor şi în condiții fiziologice normale care nu duc la inactivare. În ultimul timp se fac încercări de utilizare a altor suporturi naturale cum ar fi hepatocitele sau leucocitele. În liposomi şi fantome eritrocitare au fost microîncapsulate cele mai diverse enzime folosite în scop terapeutic.

IX.2.1.4 Alte metode fizice de imobilizare a enzimelor

În afară de metodele fizice enunțate mai sus, în literatura de specialitate întâlnim numeroase lucrări privind imobilizarea prin alte metode cum ar fi: includerea enzimelor în membrane organice artificiale sau naturale, imobilizarea prin diferite metode a unui preparat enzimatic preimobilizat etc.

IX.2.2 Metode chimice de imobilizarea enzimelor

După cum am arătat mai sus, în cazul metodelor fizice de imobilizare, între suport şi enzimă iau naştere o serie de interacțiuni şi se formează legături relativ slabe, astfel că, în procesul de exploatare poate avea loc eluția parțială sau totală a enzimei, în funcție de concentrația substratului şi de forța ionică a soluției acestuia. Pentru o mai bună fixare a enzimelor pe suport, mulți cercetători au recurs la metode chimice de imobilizare care constau în formarea de legături covalente fie direct între enzimă şi suport fie prin intermediul liganzilor. În cazul legării directe, legăturile covalente iau naştere între grupările funcționale ale suportului şi cele ale protein-enzimei, grupări aflate, de regulă, în afara situsului activ enzimatic.

Randamentele reacțiilor enzimatice catalizate de acest tip de catalizatori heterogeni, comparativ cu enzimele libere sunt, în general, ceva mai mici decât în cazul imobilizării prin metode fizice, probabil din cauza unor uşoare modificări la nivelul structurii cuaternare sau chiar terțiare a protein-enzimei ce se pot produce prin formarea legăturilor covalente. Cu toate acestea, prin legare covalentă se obțin preparate cu o stabilitate operațională mai mare, fapt ce anulează dezavantajul mai sus menționat.

Imobilizarea chimică a enzimelor pe suporturi solide poate fi executată şi prin intermediul liganzilor care sunt, în general, compuşi chimici bifuncționali sau nesaturați. Şi în acest caz se asigură o fixare puternică a enzimei pe suport.

IX.2.2.1 Imobilizarea enzimelor prin legare covalentă

În principiu, prin imobilizarea enzimelor prin legare covalentă se poate utiliza orice tip de suport anorganic sau organic, natural, semisintetic sau sintetic care prezintă grupe funcționale adecvate formării de legături covalente. În acest caz suportul se alege în funcție de natura grupărilor funcționale ale protein-enzimei ce urmează a se imobiliza. Formarea legăturilor covalente poate induce, probabil, uşoare modificări în structura terțiară şi cuaternară a enzimei, manifestând în felul acesta o oarecare influență asupra centrului activ enzimatic ce se repercutează asupra activității catalitice a preparatului obținut.

În cazul legăturilor covalente, ce sunt legături chimice puternice, este înlăturată practic posibilitatea eluției parțiale a enzimei de pe suport în timpul exploatării. Din această cauză numeroşi cercetători utilizează această metodă pentru imobilizarea enzimelor de importanță practică.

IX.2.2.2 Imobilizarea enzimelor cu ajutorul liganzilor

O altă metodă de imobilizare covalentă a enzimelor o reprezintă fixarea acestora cu ajutorul liganzilor. Aceştia sunt substanțe bi- sau multifuncționale sau substanțe nesaturate. În procesul de imobilizare se formează câte două legături covalente pentru fiecare moleculă proteică: ligandul se fixează de suport prin intermediul uneia din grupările sale funcționale, cealaltă rămânând disponibilă pentru fixarea enzimei. În cazul folosirii în calitate de ligand

a unor compuşi nesaturaţi, aceştia dau reacţii de polimerizare sau policondensare (în speţă trimerizare respectiv tricondensare suport –ligand - enzimă), cu formarea de legături covalente între cei trei componenţi ai sistemului (tabelul IX).

Tabelul IX

Metode de activare a suporturilor de imobilizare prin intermediul liganzilor

Nr.	Gruparea funcţională din enzimă	Gruparea funcţională din suport	Metode de activare
1.	$-NH_2$	-COOH	carbodiimidă, reactiv Woodward, $NaNO_2$ N-CO-Cl
2.	$-NH_2$	-OH	halogenare, clortriazină BrCN; ClCN
3.	$-NH_2$	$-NH_2$	glutaraldehidă şi alţi reactivi pluri- funcţionali
4.	$-NH_2$	$—C(=O)—C(=O)=O$	reacţie directă
5.	-COOH	$-NH_2$	Carbodiimidă, reactiv Woodward, izotiocianat
6.	-tirozină	-fenilalanină	săruri de diazoniu, izocianat,izotiocianat
7.	-SH	-SH	punţi disulfidice

Avantajul acestei metode constă în faptul că se poate realiza o imobilizare optimă alegând ligandul specific în funcţie de natura grupărilor funcţionale ale suportului şi respectiv enzimei ce urmează a se imobiliza. În tabelul II redăm câteva metode de activare a grupărilor funcţionale din suporturi cu ajutorul liganzilor. Metoda de imobilizare a enzimelor pe suporturi solide cu ajutorul liganzilor este din ce în ce mai des folosită în ultimii ani.

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Analizând literatura de specialitate se poate concluziona că aldehida glutarică este ligandul consacrat, tot mai mulți cercetători folosind acest reactiv în vederea activării celor mai diferite suporturi. Noi am testat posibilitatea imobilizării unor enzime (catalaza, ureaza etc.) pe fibre de celuloză prin reticulare cu aldehidă glutarică. Pentru obținerea unor caracteristici optime, în mediul de cuplare s-a introdus o proteină inertă (serumalbumina) care participă la procesul de reticulare (fig. 152). Reacțiile s-au realizat la +4°C timp de 20-24 de ore după care preparatele au fost spălate cu soluții tampon adecvate pentru înlăturarea excesului de enzimă.

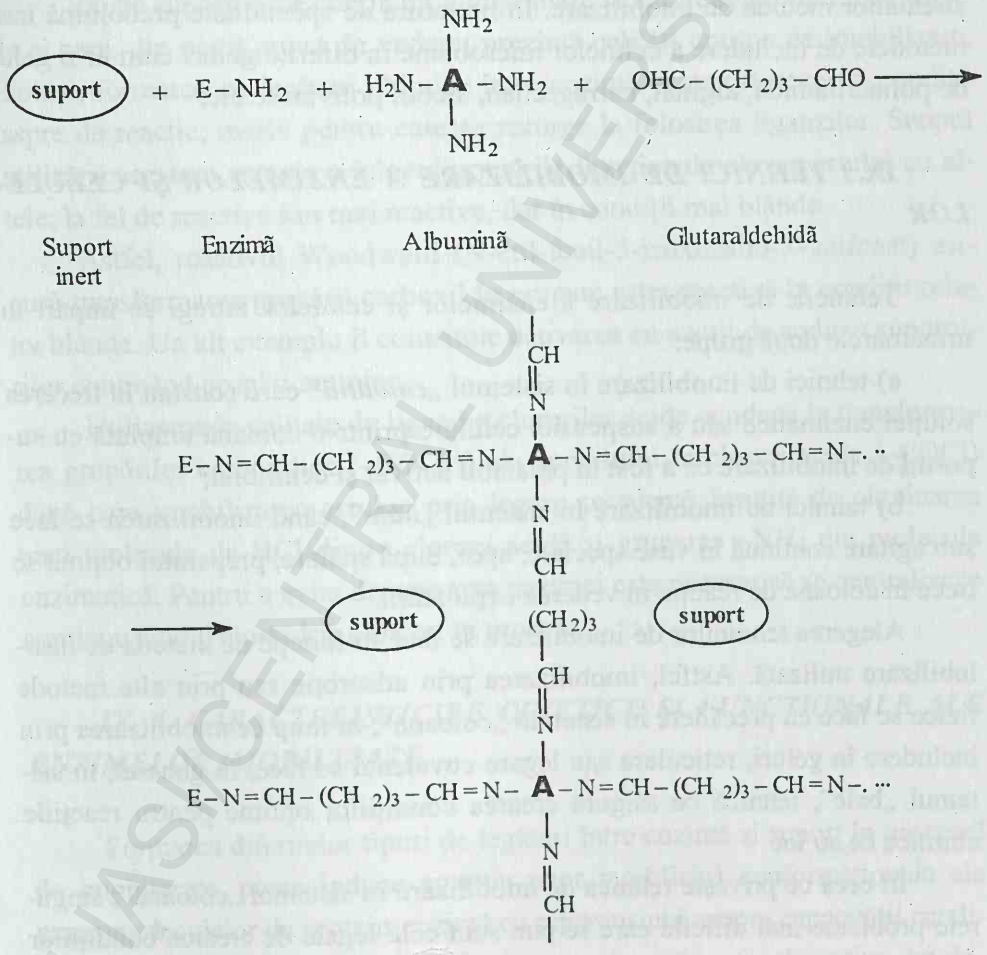


Fig. 152. Reprezentarea schematică a imobilizării enzimelor pe fibre de celuloză prin reticulare cu aldehidă glutarică

BCU IAȘI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

IX.2.3 Metode de imobilizare a celulelor întregi

În general, pentru imobilizarea celulelor se folosesc aceleaşi tipuri de suport şi aceleaşi metode ca în cazul enzimelor. Rezultate superioare se obţin, de regulă, la celulele imobilizate prin includere în geluri (entrapare) sau reticulare în (co-)polimeri, deoarece prin aceste metode se evită blocarea grupărilor funcţionale ale constituenţilor peretelui celular, imobilizarea efectuându-se prin simpla „reţinere" mecanică a celulelor în structura suportului.

Cu toate acestea, în cazuri speciale, se obţin rezultate bune şi prin folosirea altor metode de imobilizare. În literatura de specialitate predomină însă metodele de includere a celulelor microbiene în diferite geluri cum ar fi gelul de poliacrilamidă, alginat, carrageenan, alcool polivinilic etc.

IX.3 TEHNICI DE IMOBILIZARE A ENZIMELOR ŞI CELULELOR

Tehnicile de imobilizare a enzimelor şi celulelor întregi se împart în următoarele două grupe:

a) tehnici de imobilizare în sistemul „***coloană***" care constau în trecerea soluţiei enzimatice sau a suspensiei celulare printr-o coloană umplută cu suportul de imobilizare ce a fost în prealabil activat şi echilibrat;

b) tehnici de imobilizare în sistemul „***baie***", când imobilizarea se face sub agitare continuă în vase speciale, apoi, după spălare, preparatul obţinut se trece în coloana de reacţie în vederea exploatării.

Alegerea tehnicilor de imobilizare se face în funcţie de metoda de insolubilizare utilizată. Astfel, imobilizarea prin adsorbţie sau prin alte metode fizice se face cu precădere în sistemul „coloană", în timp ce imobilizarea prin includere în geluri, reticulare sau legare covalentă se face, în general, în sistemul „baie", tehnică ce asigură crearea condiţiilor optime pentru reacţiile chimice ce au loc.

În ceea ce priveşte tehnica de imobilizare în sistemul „coloană", singurele probleme mai dificile care se pun sunt cele legate de crearea condiţiilor optime de fixare (pH, temperatură etc.) condiţii care să nu ducă la inactivarea enzimelor. Această tehnică este similară cromatografiei pe coloană executîndu-se în condiţii identice.

Tehnicile de imobilizare în sistemul „baie" sunt ceva mai complexe din cauza condițiilor aspre în care au loc reacțiile chimice. În general, aceste tehnici se aseamănă cu cele din sinteza chimică organică cu deosebirea că se fac anumite modificări în scopul creării unor condiții mai blânde de reacție care să nu denatureze proteinele.

De obicei, în cazul imobilizării prin legare covalentă directă, prin reticulare sau includere, formarea suportului are loc concomitent cu imobilizarea (în cazul suporturilor sintetice), reacțiile chimice respective executându-se în mod obligatoriu în condiții fiziologice normale de pH și temperatură.

Există suporturi ce conțin un număr mare și variat de grupări funcționale și care, din acest punct de vedere, prezintă calități optime de imobilizare. Totuși, formarea de legături chimice între enzimă și suport necesită condiții aspre de reacție, motiv pentru care se recurge la folosirea liganzilor. Scopul utilizării acestora este de a înlocui grupările funcționale ale suportului cu altele, la fel de reactive sau mai reactive, dar în condiții mai blânde.

Astfel, reactivul Woodward (N-etil-fenil-5-izoxozalin-3'-sulfonat) asigură transformarea grupării carboxil în grupare ester reactivă în condiții relativ blânde. Un alt exemplu îl constituie activarea cu azotit de sodiu a suporturilor conținând grupări aminice.

Utilizarea în calitate de ligand a clorurilor acide conduce la transformarea grupărilor carboxilice (–COOH) ale suportului în cloruri acide (–COCl) după care imobilizarea are loc prin legare covalentă însoțită de eliminarea unei molecule de HCl dintre clorura acidă și gruparea $–NH_2$ din molecula enzimatică. Pentru a evita denaturarea enzimei este necesar să se neutralizeze continuu acidul clorhidric eliberat în proces.

IX. 4. CARACTERISTICILE CINETICE ȘI FUNCȚIONALE ALE ENZIMELOR IMOBILIZATE

Formarea diferitelor tipuri de legături între enzimă și suport în procesul de imobilizare, poate induce apariția unor modificări conformaționale ale macromoleculelor de protein-enzimă cu repercusiuni asupra capacității catalitice. În afară de parametrii cinetici ce caracterizează enzimele native, imobilizatele enzimatice prezintă și unele proprietăți specifice. În general, la imobilizarea oricărei enzime se urmăresc următoarele aspecte:

a) alegerea condițiilor optime de imobilizare:

- alegerea suportului optim;
- alegerea metodei optime de imobilizare în funcție de numărul și natura grupelor funcționale ale suportului, precum și în funcție de scopul final urmărit;
- alegerea tehnicii de imobilizare;
- alegerea condițiilor optime de pH, temperatură etc. în care să se realizeze imobilizarea.

b) determinarea principalilor parametri cinetici și funcționali ai imobilizatelor enzimatice obținute:

- determinarea capacității de imobilizare (mg enzimă/g suport);
- studiul influenței pH-ului și temperaturii mediului asupra vitezei reacției catalizate de enzima imobilizată respectivă;
- studiul influenței concentrației substratului asupra vitezei de reacție și determinarea constantei K_M;
- determinarea timpului de stocare operațională;
- determinarea timpului de înjumătățire a activității catalitice.

IX.4.1 Alegerea condițiilor optime de imobilizare

Acest aspect este extrem de important, dat fiind faptul că în funcție de condițiile în care se realizează cuplarea va depinde activitatea catalitică a preparatului obținut. Deoarece capacitatea catalitică a oricărei enzime imobilizate diferă de valoarea aceluiași parametru specifică formelor libere, fiind de regulă inferioară acesteia, activitatea enzimatică a preparatelor imobilizate poartă numele de ***activitate remanentă.***

Pentru ca aceasta să fie cât mai mare posibil, ***alegerea suportului*** se face în așa fel încât procesul de cuplare să inactiveze cât mai puțin enzima. De obicei alegerea suportului se face în funcție de metoda de imobilizare ce urmează a fi folosită (legare prin interacțiuni fizice sau prin covalență) și în funcție de grupele funcționale pe care acesta le conține și care pot fi implicate în interacțiunile dintre enzimă și suport.

Alegerea metodei optime de imobilizare se face, în principal, în funcție de procesul de transformare în care va fi folosit viitorul preparat. De exemplu, dacă aceste transformări presupun utilizarea unor soluții (soluții tampon, soluții de substrat etc.) cu forțe ionice superioare, se vor utiliza preponderent metodele chimice de cuplare în așa fel încât în procesul de exploa-

tare a preparatului să nu aibă loc eluția enzimei de pe suport. Dintre metodele fizice de imobilizare, în acest caz se utilizează cel mai adesea reticularea în diferite geluri precum și imobilizarea prin microîncapsulare. Atunci când nu există pericolul eluției enzimei de pe suport, se utilizează imobilizarea prin adsorbție sau alte metode fizice de cuplare datorită simplității și rapidității cu care pot fi executate.

Alegerea tehnicii de imobilizare pune mai puține probleme. În diferite situații poate fi utilizată atât imobilizarea în ***sistemul coloană***, cât și în ***sistemul baie***, cu condiția să se realizeze un contact cât mai intim între enzimă și suport. Mulți autori preferă sistemul baie deoarece se poate realiza cuplarea sub agitare continuă în așa fel încât suspensia ce formează mediul de reacție să se omogenizeze cât mai bine.

Alegerea condițiilor fizico-chimice optime de imobilizare este extrem de importantă deoarece aceasta determină în mod direct nivelul activității remanente. Formarea interacțiunilor fizico-chimice și chimice între enzimă și suport depinde în mare măsură de temperatura mediului de cuplare.

Deoarece există pericolul inactivării termice a enzimelor, cuplarea se realizează de obicei la rece ($0 \div +4^{\circ}C$) chiar dacă este necesară pentru aceasta prelungirea timpului de sinteză. Imensa majoritate a datelor din literatură atestă faptul că randamentele cele mai bune se obțin atunci când procesul de imobilizare este condus în medii de reacție cu valori de pH apropiate de pH-ul optim de acțiune al enzimei respective. Timpul de imobilizare este în general scurt, nedepășind câteva ore.

Obținerea unor preparate enzimatice sub formă imobilizată cu caracteristici superioare mai depinde și de alți factori: alegerea unui raport optim suport/enzimă, alegerea unui timp optim de cuplare, stabilirea raportului optim suport/ligand etc.

În experiențele noastre privind determinarea timpului optim de cuplare în cazul imobilizării tripsinei prin reticulare cu carbodiimidă am stabilit că timpul optim de reacție este de 4 ore (tabelul X).

După 2 ore de reacție, activitatea enzimatică reprezintă puțin peste 50 % din activitatea maximă obținută în cazul realizării cuplării timp de 4 ore. Prelungirea timpului de sinteză determină diminuarea activității enzimatice a preparatului obținut. Pentru aceeași enzimă am stabilit un raport optim suport/enzimă de 12,5/1 (tabelul XI).

Tabelul X

Dinamica activității tripsinei imobilizate pe Xantan reticulat cu carbodiimidă în funcție de timpul de sinteză

Nr. crt.	Timpul de sinteză (ore)	Activitate enzimatică		
		µM/min	µM/min.g s..u.	%
1.	2	0.210	9,49	51,86
2.	4	0,260	18,31	100,00
3.	8	0.235	11,28	61,61
4.	16	0,190	2,84	15,51

Tabelul XI

Influența raportului suport/enzimă asupra activității tripsinei imobilizate prin reticulare

Nr. crt.	Suport (g)	Tripsină (mg)	Activitate enzimatică		
			µM/min	µM/min.g s..u.	%
1.	3	30	0.210	23,90	40,44
2.	3	60	0,215	26,68	45,14
3.	3	120	0.295	28,77	48,69
4.	3	240	0,465	59,10	100,00

O dependență asemănătoare a fost obținută și în cazul influenței raportului suport/enzimă și a timpului de sinteză asupra activității α-amilazei imobilizate prin reticulare cu aldehidă glutarică (fig. 153). Activitatea amilolitică a preparatului crește odată cu creșterea concentrației de enzimă în soluția enzimatică influent și cu timpul de cuplare. Activitatea catalitică maximă a fost obținută în cazul utilizării unui raport masic de 20 mg enzimă/g suport când timpul de cuplare a fost 120 de minute.

Și în cazul imobilizării celulelor întregi se observă o strânsă interdependență între activitatea catalitică a acestora și condițiile de imobilizare. Imobilizând celule de *Arthrobacter sp.*M_{10C} pe celuloză prin reticulare cu aldehidă glutarică am determinat un raport optim suport/ligand de 50/1 (tabe-

lul XII). O concentrație prea scăzută a ligandului poate determina o încărcare celulară incompletă a suportului, iar o concentrație prea mare a ligandului poate inactiva echipamentul enzimatic celular.

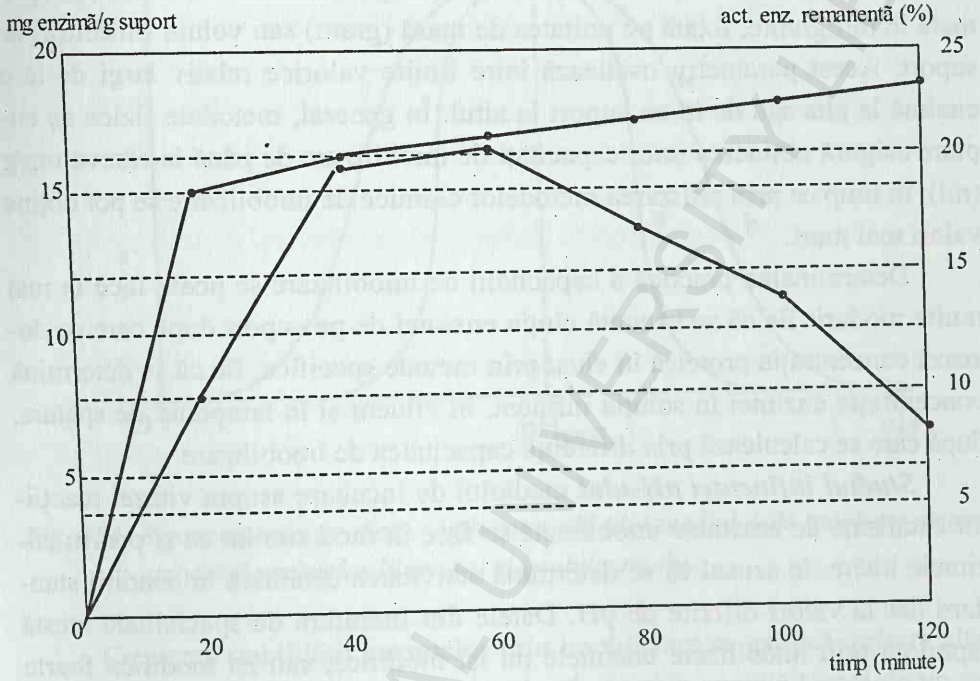


Fig. 153. Dependența activității α-amilazei imobilizate prin reticulare cu glutaraldehidă de raportul suport/enzimă (-◆-) și timpul de cuplare (-■-) (Cojocaru, C.D. – 1992)

Tabelul XII

Dinamica activității ureazice a celulelor de Arthrobacter sp.M_{10C} în funcție de raportul masic suport/ligand

Nr. crt.	Raport suport/ligand	Activitate ureazică	
		U/g s.u.	%
1	100:1	3,08	97,78
2	50:1	3,15	100,00
3	25:1	1,71	54,29
4	12,5:1	1,52	48,25

IX.4.2 Determinarea parametrilor cinetici şi funcţionali ai enzimelor imobilizate

Prin ***capacitate de imobilizare*** se înţelege cantitatea de enzimă, exprimată în miligrame, fixată pe unitatea de masă (gram) sau volum (mililitru) de suport. Acest parametru oscilează între limite valorice relativ largi de la o enzimă la alta sau de la un suport la altul. În general, metodele fizice de cuplare asigură obţinerea unor capacităţi de imobilizare de până la câteva mg/g (ml), în timp ce prin utilizarea metodelor chimice de imobilizare se pot obţine valori mai mari.

Determinarea practică a capacităţii de imobilizare se poate face în mai multe moduri: fie că se execută eluţia enzimei de pe suport după care se dozează concentraţia proteică în eluat prin metode specifice, fie că se determină concentraţia enzimei în soluţia influent, în efluent şi în tamponul de spălare, după care se calculează prin diferenţă capacitatea de imobilizare.

Studiul influenţei pH-ului mediului de incubare asupra vitezei reacţiilor catalizate de enzimele imobilizate se face în mod similar ca şi pentru enzimele libere, în sensul că se determină activitatea catalitică în condiţii standard dar la valori diferite de pH. Datele din literatura de specialitate atestă faptul că prin imobilizare enzimele nu îşi modifică, sau îşi modifică foarte puţin valoarea pH-ului optim de acţiune. Pentru toate enzimele studiate de noi (catalaza, α-amilaza, β-amilaza, glucoamilaza, tripsina, pepsina, proteinaza neutră microbiană, ureaza, papaina etc.), indiferent de suportul şi metoda de imobilizare, pH-ul optim de acţiune era diferit cu cel mult o unitate de pH-ul optim specific enzimelor libere.

Dacă valoarea pH-ului optim de acţiune a enzimelor se modifică foarte puţin prin imobilizare, nu acelaşi lucru se poate spune în privinţa stabilităţii acestora faţă de reacţia mediului. În majoritatea cazurilor se observă o creştere a stabilităţii enzimelor imobilizate comparativ cu formele libere faţă de pH-ul mediului, concomitent cu o creştere a intervalului de pH în care enzima este activă. Graficul dependenţei vitezei reacţiilor enzimatice de pH-ul mediului de incubare are acelaşi aspect gaussian, dar cu o deschidere mai mare (fig. 154).

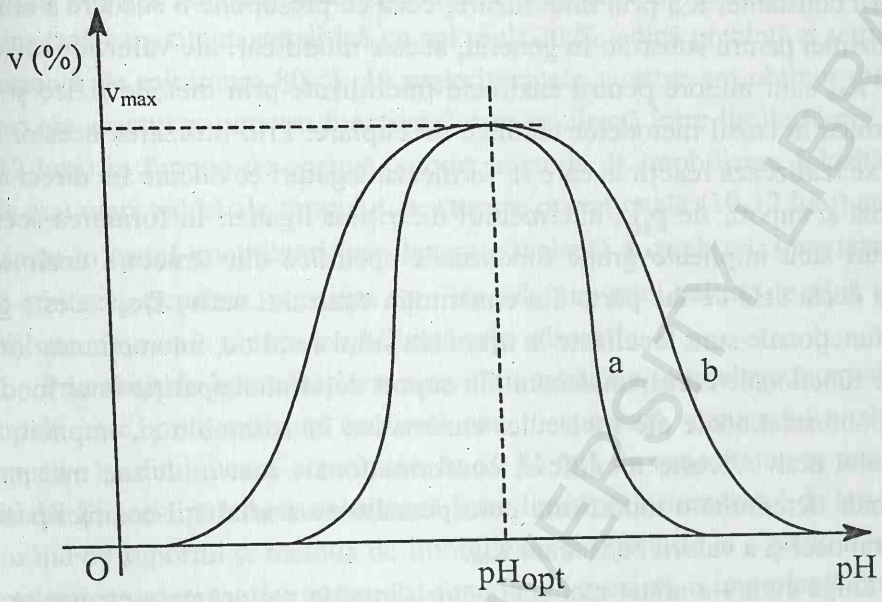


Fig. 154. Reprezentarea grafică a influenței pH-ului mediului de incubare asupra activității enzimelor libere (a) și imobilizate (b)

Creşterea stabilității enzimelor prin imobilizare se explică, printre altele, prin faptul că în jurul macromoleculei de protein-enzimă legată de un suport insolubil se creează un micromediu în care modificarea pH-ului se face mai lent. Cu alte cuvinte, în jurul fiecărei molecule enzimatice se creează un gradient de pH în sens crescător sau descrescător în funcție de pH-ul mediului, în aşa fel încât în imediata vecinătate a enzimei, pH-ul este mai apropiat de pH-ul optim de acțiune comparativ cu zonele mai îndepărtate.

Determinarea ***temperaturii optime de acțiune*** şi a influenței acestui factor fizic asupra vitezei de reacție se face în mod similar ca în cazul evaluării influenței pH-ului mediului. Determinarea acestor parametri cinetici este de o importanță majoră întrucât, prin utilizarea practică a enzimelor imobilizate în diferite procese de biotransformare nu este posibilă întotdeauna menținerea cu mare exactitate a pH-ului şi temperaturii mediului la valori constante.

Şi în cazul ***constantei Michaelis*** K_M au loc modificări prin imobilizare. În unele situații constanta K_M nu se modifică, în foarte puține cazuri aceasta se micşorează, iar pentru marea majoritate a enzimelor se observă o creştere a

valorii constantei K_M prin imobilizare, ceea ce presupune o scădere a afinității enzimei pentru substrat. În general, aceste modificări ale valorilor constantelor K_M sunt minore pentru enzimele imobilizate prin metode fizice şi mai puternice în cazul metodelor chimice de cuplare. Prin utilizarea acestor metode se realizează reacții în care se formează legături covalente fie direct între enzimă şi suport, fie prin intermediul diferiților liganzi. În formarea acestor legături sunt implicate grupe funcționale specifice din structura enzimelor, altele decât cele ce fac parte din constituția centrului activ. Deşi aceste grupări funcționale sunt localizate în afara situsului catalitic, interacțiunea lor cu grupe funcționale corespunzătoare din suport determină apariția unor modificări conformaționale ale moleculei enzimatice în ansamblu şi, implicit, ale centrului activ. Aceste modificări conformaționale mai mult sau mai puțin profunde determină o modificare corespunzătoare a afinității enzimei pentru substrat deci şi a valorii constantei K_M.

După cum s-a arătat mai sus, pentru imensa majoritate a enzimelor se observă o modificare a constantei K_M prin imobilizare. Deoarece semnificația biochimică a acestui parametru este aceeaşi, precum şi datorită faptului că ea se referă la aceeaşi pereche enzimă-substrat, această constantă cinetică a enzimelor imobilizate poartă numele de ***constantă Michaelis aparentă*** şi se notează cu K'_M.

Chiar dacă $K'_M > K_M$ pentru marea majoritate a enzimelor imobilizate, importanța practică a acesteia nu scade, acest dezavantaj fiind anulat chiar şi numai de avantajul net al posibilei utilizării repetate a aceluiaşi preparat enzimatic spre deosebire de biotehnologiile bazate pe folosirea enzimelor libere ce pot fi întrebuințate o singură dată, iar produsul transformării trebuie apoi purificat de urmele de proteină.

Enzimele imobilizate pot fi caracterizate şi prin doi parametri funcționali importanți care reflectă gradul de inactivare în timp a acestor biocatalizatori prin stocare în condiții optime de conservare şi respectiv prin utilizarea lor periodică în procese de biotransformare specifice. Este vorba de timpul de stocare operațională şi respectiv timpul de înjumătățire a activității enzimatice.

Prin ***timp de stocare operațională*** se înțelege intervalul de timp în care un preparat enzimatic imobilizat poate realiza cicluri de transformare fără ca activitatea enzimatică să scadă semnificativ. Mulți autori consideră timpul de stocare operațională ca fiind intervalul de timp în care, catalizând reacții spe-

cifice în procese continue sau discontinue, enzima imobilizată respectivă îşi diminuează capacitatea catalitică cu cel mult 20 %, adică prezintă o activitate remanentă de minimum 80 %. În experimentele noastre am obţinut diferite valori ale acestui parametru funcţional care oscilează între limite foarte largi (1-12 luni) în funcţie de enzimă, suport, metoda de imobilizare folosită etc. Cele mai mari valori ale timpului de stocare operaţională (10-12 luni) au fost obţinute în cazul imobilizări prin legare covalentă a catalazei, invertazei, α- şi β-amilazei, pepsinei, papainei etc., iar cele mai mici valori (de până la 1-2 luni) s-au obţinut la ureaza imobilizată prin adsorbţie.

Prin ***timp de înjumătăţire*** a activităţii catalitice se înţelege intervalul de timp în care, prin utilizare continuă sau discontinuă, preparatul enzimatic respectiv îşi diminuează activitatea cu 50 % faţă de capacitatea sa catalitică iniţială. Şi acest parametru oscilează între limite valorice destul de largi, depinzând de suportul şi metoda de imobilizare şi diferă de la o enzimă la alta. Determinarea acestor doi parametri funcţionali prezintă o importanţă practică deosebită, ei reprezentând un adevărat „termen de garanţie" al fiecărui preparat.

Enzimele imobilizate pot prezenta un comportament diferit de cel al formelor native faţă de acţiunea **efectorilor** şi în special a **inhibitorilor**. În majoritatea cercetărilor noastre am studiat şi acest aspect, obţinând rezultate interesante în studiul comparativ al acţiunii inhibitorilor specifici asupra activităţii catalazei libere şi imobilizate prin legare covalentă. Este cunoscut faptul că activitatea catalazică este puternic inhibată, printre altele, de azida de sodiu şi de către hidroxilamină. Pentru a determina modul în care acţionează aceşti inhibitori asupra catalazei imobilizate comparativ cu enzima liberă, am determinat în paralel activitatea catalitică în prezenţa unor concentraţii diferite de inhibitor. În cazul studiului acţiunii hidroxilaminei (fig. 155) am determinat activitatea catalazei libere şi imobilizate în prezenţa hidroxilaminei a cărei concentraţie a fost cuprinsă între 10^{-3} M şi 10^{-8} M.

Enzima nativă a fost complet inhibată la o concentraţie a efectorului de 10^{-5} M în timp ce forma imobilizată este inhibată complet la o concentraţie mult mai mare (10^{-3} M).

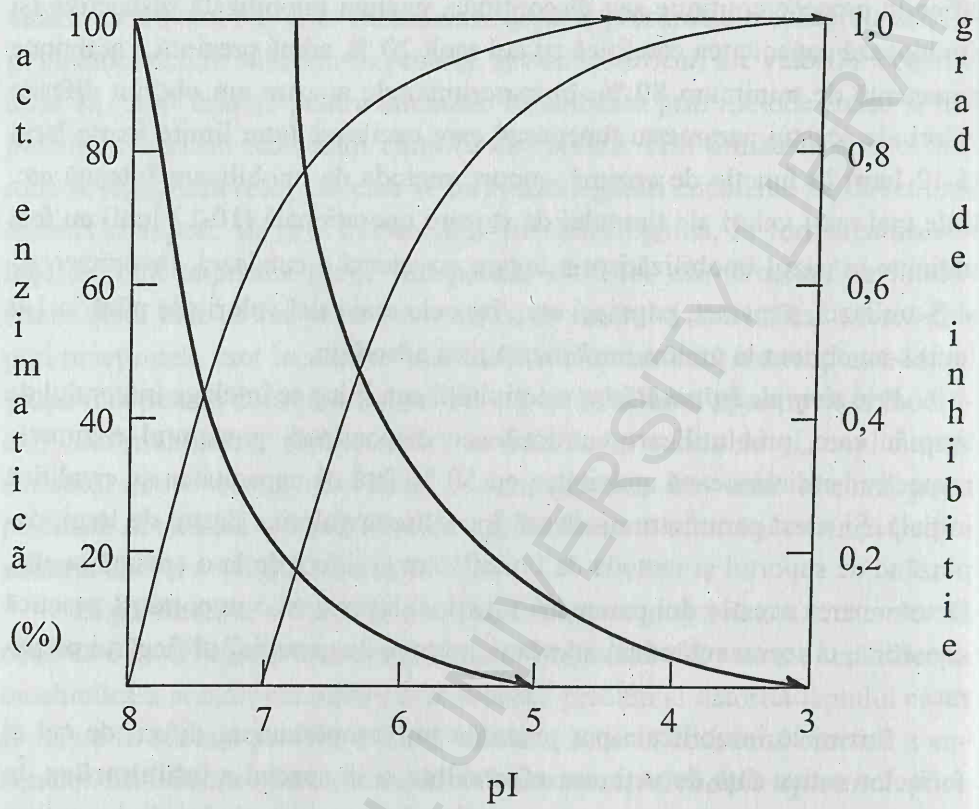


Fig. 155. Acţiunea hidroxilaminei asupra activităţii catalazei libere (1) şi imobilizate(2); (—— inhibiţie; ——— activitate enzimatică) (Cojocaru, C.D. – 1992)

În graficul prezentat au fost trecute pe abscisă valorile –log[I] deoarece marcarea directă a concentraţiei inhibitorului este practic imposibilă din cauza domeniului larg de valori. Acţiunea inhibantă a hidroxilaminei începe să se manifeste asupra enzimei native la concentraţii foarte mici, de numai 10^{-8} M în timp ce catalaza imobilizată începe să fie inhibată la o concentraţie a hidroxilaminei de 10^{-7} M. Aceste date demonstrează o uşoară creştere a stabilităţii enzimei prin imobiliare faţă de acţiunea inhibantă a hidroxilaminei. Rezultate asemănătoare am obţinut şi în experimentele în care am studiat acţiunea azidei de sodiu (fig. 156).

Catalaza liberă este complet inhibată la o concentraţie a azidei de sodiu de 10^{-2} M în timp ce enzima imobilizată prezintă o activitate remanentă ce reprezintă aproximativ 20% din activitatea maximă, nefiind complet inhibată

BCU "ION CREANGĂ" CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

nici la 10^{-1} M NaN_3. Deci şi faţă de anionii N^-_3, care sunt inhibitorii specifici ai catalazei, se observă o creştere a stabilităţii enzimei prin imobilizare. Date din literatură atestă faptul că acest comportament este general, marea majoritate a enzimelor imobilizate prezentând o stabilitate mai mare faţă de efectori comparativ cu formele native.

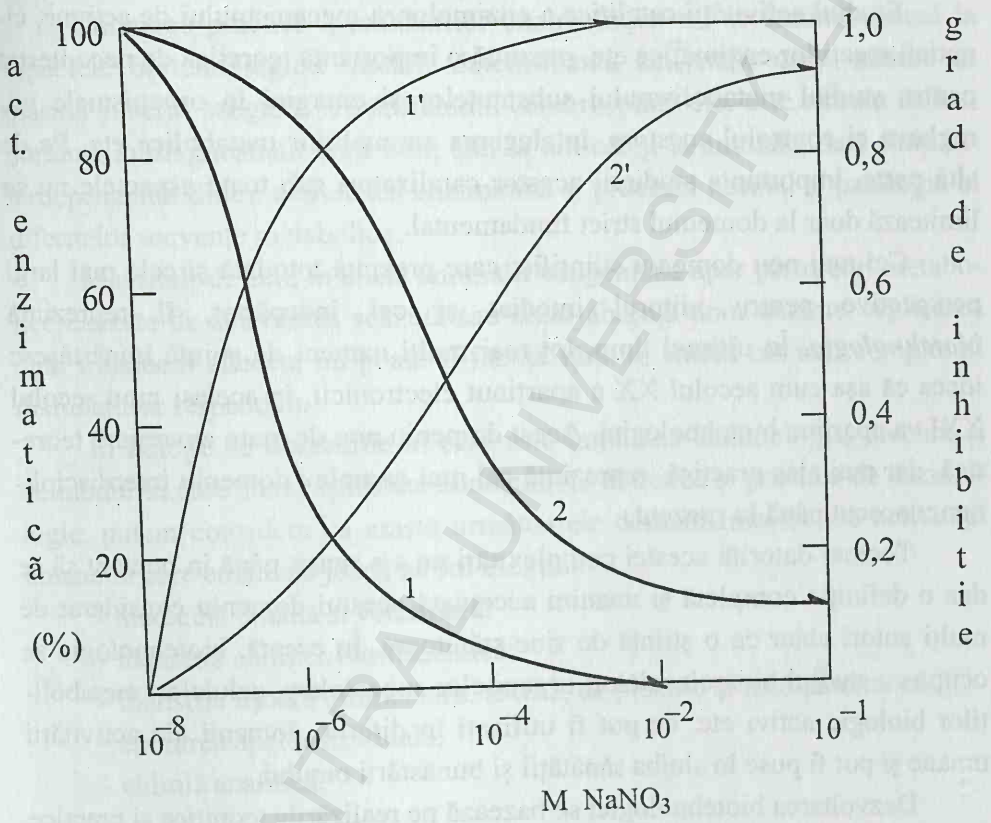


Fig. 156. Acţiunea azidei de sodiu asupra activităţii catalazei libere (1) şi imobilizate (2); grad de inhibiţie = 1-v_i/v; (—— inhibiţie; ——— activitate enzimatică) (Cojocaru, C.D. – 1992)

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

X. UTILIZAREA PRACTICĂ A ENZIMELOR

Studiul activității catalitice a enzimelor, a mecanismului de acțiune, cineticii reacțiilor enzimatice etc. prezintă o importanță teoretică de necontestat pentru studiul metabolismului substanțelor și energiei în organismele vii, reglarea și controlul acestora, înțelegerea anomaliilor metabolice etc. Pe de altă parte, importanța studierii acestor catalizatori sub toate aspectele nu se limitează doar la domeniul strict fundamental.

Cel mai nou domeniu științific, care prezintă totodată și cele mai largi perspective pentru viitorul imediat și cel îndepărtat, îl reprezintă ***biotehnologia***. În ultimul timp, tot mai mulți oameni de știință împărtășesc ideea că așa cum secolul XX a aparținut electronicii, în același mod secolul XXI va aparține biotehnologiei. Acest domeniu nou de mare anvergură teoretică, dar mai ales practică, reprezintă cel mai complex domeniu interdisciplinar cunoscut până în prezent.

Tocmai datorită acestei complexități nu s-a reușit până în prezent să se dea o definiție completă și unanim acceptată acestui domeniu considerat de mulți autori chiar ca o știință de sine stătătoare. În esență, biotehnologia se ocupă cu studiul biomoleculelor, organitelor subcelulare, celulelor, metaboliților biologic activi etc. ce pot fi utilizați în diferite domenii ale activității umane și pot fi puse în slujba sănătății și bunăstării omului.

Dezvoltarea biotehnologiei se bazează pe realizările teoretice și practice cele mai importante ale biochimiei (mai cu seamă ale enzimologiei și ale biochimiei vitaminelor și hormonilor), biologiei moleculare și celulare, geneticii, microbiologiei generale și industriale, fiziologiei, biofizicii, chimiei organice, electronicii etc.

În ceea ce privește importanța enzimologiei pentru cercetarea și producția biotehnologică, actualmente se disting două posibilități de valorificare a cunoștințelor în acest domeniu:

- aplicarea cunoștințelor teoretice și practice de enzimologie în vederea realizării unor procese de biotransformare în industria de sinteză și semisinteză precum și în optimizarea unor procese tehnologice din industria de medicamente, panificație, industria vinului, berii și băuturilor spirtoase,

industria de prelucrare a laptelui, conservarea legumelor şi fructelor, industria de cofetărie etc.

- imobilizarea enzimelor, structurilor subcelulere şi a celulelor întregi şi utilizarea preparatelor obţinute în medicină, chimia analitică, industria uşoară, industria chimico-farmaceutică etc.

Utilizarea practică a realizărilor enzimologiei nu se rezumă numai la aspectele biotehnologice. Astfel, determinarea activităţii unor enzime în plasma şi serul sanguin, urină, lichidul cerebrospinal etc. este extrem de importantă în diagnosticul unor boli, atât la om cât şi la animale, dată fiind interdependenţa dintre activitatea enzimatică şi procesul normal şi patologic al diferitelor secvenţe metabolice.

Mai mult de atât, în unele anomalii congenitale apar perturbări metabolice cauzate de activitatea scăzută sau chiar absenţa unor enzime. Aplicarea unui tratament adecvat nu poate fi făcută fără un studiu cât mai complet al disfuncţiilor respective.

În funcţie de domeniile în care este implicată enzimologia, precum şi de modul în care sunt exploatate cunoştinţele teoretice şi practice de enzimologie, putem considera că există următoarele domenii majore ale activităţii umane în care enzimele joacă un rol esenţial:

- medicină umană şi veterinară;
- industria chimico-farmaceutică;
- industria uşoară (alimentară, textilă, de pielărie şi încălţăminte etc.);
- epurarea apelor reziduale;
- chimia analitică.

X.1 IMPORTANŢA ENZIMELOR PENTRU PRACTICA MEDICALĂ

Realizările teoretice şi practice ale enzimologiei sunt utilizate în practica medicală în două moduri distincte:

- determinarea activităţii enzimelor tisulare şi din lichidele biologice în scop de diagnostic;
- utilizarea enzimelor native şi/sau imobilizate în tratamentul unor enzimopatii.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

X.1.1 Determinarea activității enzimelor în diagnostic şi tratament

Apariția şi evoluția diferitelor afecțiuni patologice este întotdeauna însoțită de modificări mai mult sau mai puțin profunde ale valorilor anumitor parametri biochimici care atestă perturbări ale unor secvențe metabolice. Determinarea activității enzimelor participante la aceste secvențe constituie principala metodă de evaluare a perturbărilor metabolice respective şi implicit un element important de care se ține seama în stabilirea diagnosticului şi urmărirea evoluției bolii în perioada tratamentului medical.

Pe de altă parte, se cunoaşte un mare număr de maladii ce reprezintă consecința unor defecte enzimatice. În asemenea situații, activitatea scăzută sau chiar absența unor enzime reprezentă **cauza** maladiilor respective spre deosebire de situația descrisă mai sus când bolile respective au o altă etiologie, iar modificarea activității unor enzime reprezintă **efectul** acestora. În ambele situații, determinarea activității enzimelor respective este deosebit de importantă pentru diagnosticul paraclinic. În consecință există două situații:

- **bolile congenitale** de metabolism ce corespund unui deficit enzimatic;

- **blocajul activității catalitice** a enzimelor sub acțiunea unor inhibitori specifici ce apar în organism din diferite motive.

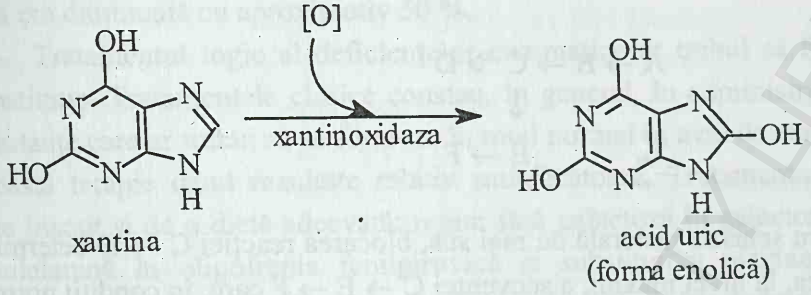
Absența sau diminuarea activității unei enzime este descrisă deseori în medicină ca o blocare a reacției catalizate de enzima în cauză. În realitate, expresia „blocaj metabolic" nu este corectă deoarece în asemenea situații este inhibată o anumită secvență metabolică, iar organismul viu dispune, deseori, de căi metabolice „ocolitoare". Care pot fi repercusiunile unui blocaj metabolic ? Să presupunem secvența metabolică de tipul:

$$A \rightarrow B \rightarrow C \rightarrow D \rightarrow E \rightarrow F$$

în care este blocată etapa C → D. În aceste condiții va avea loc o diminuare, sau chiar anularea formării metabolitului intermediar D:

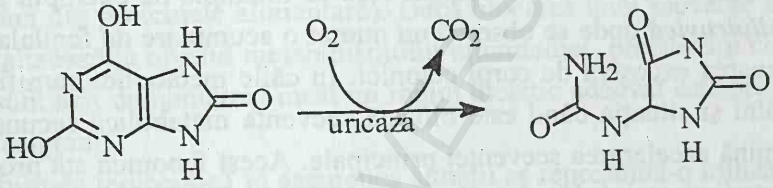
$$A \rightarrow B \rightarrow C \not\rightarrow D$$

Acest exemplu, extrem de simplu de altfel, se aplică în cazul blocării biosintezei alantoinei din acid uric în absența uricazei:



xantina

acid uric
(forma enolică)



acid uric
(forma cetonică)

alantoina

Inexistența uricazei sau activitatea sa scăzută determină inevitabil creşterea concentrației acidului uric în sânge şi eliminarea sa masivă pe cale renală.

Un alt exemplu îl reprezintă diminuarea formării glucozei în ***glicogenoza de tip I*** (*van Gierke*) în absența glucozo-6-fosfatazei. Boala poate fi cauzată fie de un blocaj complet fie de unul parțial. Tabloul clinic poate fi mai complicat deoarece deficitul de glucoză poate fi insignifiant sau nu poate fi detectat în asemenea situații fiind decelată doar activitatea scăzută a enzimei.

Consecințele unor astfel de situații carențiale pot fi paradoxale deoarece diminuarea formării unui anumit metabolit intermediar determină perturbarea mecanismului de reglare prin retroinhibiție. De exemplu, în sindromul Lesch-Nyham (boală hiperuricemică cu eliminare masivă de acid uric prin urină) are loc o intensificare a biosintezei bazelor azotate purinice. Se admite că datorită deficitului de ***hipoxantin-guanin-fosforibozil-transferază***, conversia hipoxantinei şi guaninei în mononucleotidele corespunzătoare (GMP şi IMP) este blocată, retroinhibiția este anulată (inhibiția enzimei de către AMP) şi deci are loc o creştere a concentrației purinelor.

Alte anomalii metabolice prin deficit enzimatic se întâlnesc în cazul căilor metabolice ramificate:

$$A \rightarrow B \rightarrow C \begin{array}{l} \nearrow D \\ \downarrow \\ E \rightarrow F \end{array}$$

Pentru schema generală de mai sus, blocarea reacției C → D determină funcționarea, la nivel maxim, a secvenței C → E → F care, în condiții normale, îndeplinește un rol secundar. Așa se întâmplă de exemplu în ***oligofrenia fenilpiruvică*** unde se observă nu numai o acumulare de fenilalanină (C) ci și formarea excesivă de corpi cetonici. În căile metabolice ramificate se poate întâlni și situația când este blocată secvența metabolică secundară care determină accelerarea secvenței principale. Acest fenomen stă probabil la baza creșterii vitezei de biosinteză a colesterolului în hiperlipemii.

Deficiențele enzimatice se manifestă în toate celulele, indiferent dacă ele sunt de natură genetică sau nu. Aceasta nu înseamnă însă că simptomatologia caracteristică apare la nivelul tuturor organelor deoarece doar unele organe îndeplinesc rol specific din punctul de vedere al secvenței metabolice vizate. Pe de altă parte, deficiențele enzimatice provoacă de obicei manifestări patologice la nivelul mai multor sisteme, acestea putând prezenta la rândul lor interes clinic și/sau diagnostic. De exemplu ***galactozemia*** este o boală cauzată de o deficiență enzimatică cu repercusiuni asupra mai multor organe.

La acești bolnavi este absentă ***galactozo-1-fosfat-uridil-transferaza*** și astfel are loc o acumulare de galactoză și galactozo-1-fosfat. Din punct de vedere clinic, această anomalie se manifestă prin hepatosplenomegalie ce evoluează spre ciroză cu retardare psihică. Pot să apară și leziuni renale care determină hiperalbuminurie și, respectiv, hiperaminoacidurie. Tabloul clinic este agravat dacă acestei anomalii i se suprapune avitaminoza.

Ca multe alte anomalii congenitale, galactozemia este frecvent familială, dar nu se întâlnește la două generații succesive. Aceasta înseamnă că ea se transmite recesiv, bolnavii având o pereche de gene anormale. Ținând cont de ipoteza „***o genă - o enzimă***" multe cercetări au încercat să determine dacă metabolismul galactozei este sau nu perfect normal la părinții bolnavilor res-

pectivi. S-a găsit, în toate cazurile, o activitate net inferioară a galactozo-1-fosfat-uridil-transferazei în hematii, iar capacitatea acestora de a oxida galactoza era diminuată cu aproximativ 50 %.

Tratamentul logic al deficienţelor enzimatice ar trebui să fie unul de substituţie. Tratamentele clasice constau, în general, în administrarea acelor substanţe care ar trebui să se formeze în mod normal în aval de etapa blocată, această terapie dând rezultate relativ satisfăcătoare. Tratamentul respectiv este însoţit şi de o dietă adecvată: regim fără galactoză în galactozemie, fără fenilalanină în oligofrenia fenilpiruvică şi substituirea niazinei în boala *Hartnup*. Uneori, aceste diete sunt însă greu de realizat (de exemplu excluderea fenilalaninei din proteinele alimentare). Dacă blocarea unei secvenţe metabolice se realizează la nivelul metabolismului intermediar, precursorii ce se acumulează sunt atât de numeroşi încât un regim dietetic adecvat este practic imposibil de asigurat.

O posibilitate terapeutică în asemenea situaţii ar reprezenta-o utilizarea antimetaboliţilor. Astăzi este posibilă, de exemplu, inhibarea ***xantin-oxidazei*** cu alopurinol care determină o scădere considerabilă a nivelului acidului uric în sânge, în timp ce concentraţia xantinei şi hipoxantinei creşte. Se reuşeşte în felul acesta înlocuirea efectelor patologice ale unui blocaj la un nivel defavorabil cu efecte ale unui blocaj la un nivel mai puţin periculos.

Fenomene asemănătoare au loc în alte două cazuri. În carenţa de antipirină se observă apariţia precoce a bronşitelor cronice, probabil din cauza imposibilităţii inactivării tripsinei leucocitare. Această afecţiune are un efect invers deficienţelor enzimatice. Prin tratamentul cu dicumarină se induce o scădere a activităţii enzimatice prin intervenţia antivitaminei în prima etapă a formării produsului.

O metodă de diagnostic eficientă trebuie să fie fiabilă, sensibilă, specifică şi inofensivă pentru pacient.

Fiabilitatea unei metode depinde în primul rînd de exactitatea sa. Dată fiind marea susceptibilitate a activităţii enzimelor faţă de acţiunea diferiţilor factori fizico-chimici (pH, temperatură, prezenţa sau absenţa efectorilor etc.) dozările enzimatice în scop de diagnostic trebuie executate cu o acurateţe desăvârşită. Exactitatea rezultatelor nu poate fi apreciată decât pentru analizele efectuate în condiţii identice din toate punctele de vedere: timpul, puritatea şi concentraţia reactivilor, pH-ul, temperatura, aparatura electronică de laborator etc. De cele mai multe ori este subestimat rolul temperaturii.

Pentru eliminarea erorilor determinate de eventualele diferențe de temperatură, este absolut necesară utilizarea unor **termostate de mare exactitate** (ultratermostate) care să mențină temperatura corespunzătoare protocolului de lucru cu o deviere de cel mult ± 0,2°C. Dacă la aceasta se adaugă folosirea kit-urilor de reactivi şi executarea analizelor de aceeaşi persoană, se poate conta pe un grad de exactitate pe deplin mulțumitor.

Sensibilitatea metodelor enzimatice de analiză este în strânsă interdependență cu sensibilitatea extrem de crescută a fenomenelor fiziopatologice. De exemplu activitatea transaminazelor serice se dublează atunci când unul din 1000 de hepatocite îşi devarsă, dintr-un motiv sau altul, întreaga sa cantitate de TGP şi TGO în spațiul extracelular. Aşa se explică de ce acest tip de diagnostic este mult mai sensibil decât dozarea altor parametri biochimici.

Specificitatea marii majorități a dozărilor enzimatice este net superioară celorlalte metode de analiză utilizate în clinică. Specificitatea de diagnostic depinde în mare măsură de alegerea pattern-ului enzimatic.

Experimental s-a demonstrat că erorile de determinare pot fi datorate tratamentului (interferențe), manipulării şi conservării incorecte a probelor. În general, există tendința de a supraestima influența hemolizei asupra activității enzimelor luate în studiu. Este bine să se înlăture acest factor perturbant, dar absența totală a hemolizei nu este necesară întotdeauna.

În ultimul timp a început să prezinte interes tromboliza deoarece efectele ei sunt uneori destul de puternice. Astfel, *Friedel et al.* demonstrează că serul obținut prin centrifugarea cheagului timp de patru ore are o activitate lactat-dehidrogenazică cu 15-20 % mai mare decât în serul obținut prin respectarea timpilor clasici de centrifugare. Prin utilizarea plasmei sanguine în dozarea activității enzimelor se elimină efectele coagulării dar anticoagulanții nu inhibă în aceeaşi măsură diferite enzime. Tehnica ce dă rezultatele cele mai bune constă în obținerea imediată a serului (în decurs de cel mult o oră de la recoltare) şi păstrarea lui la frigider până în momentul efectuării analizei.

În prezent există două domenii importante în care evaluarea activității enzimelor orientează diagnosticul în direcția utilă. Primul domeniu îl reprezintă diagnosticul diferențial al durerilor toracice şi abdominale acute. Celălalt domeniu cuprinde manifestările preponderent epigastrice însoțite de dureri, scăderea capacității de efort şi diferite dereglări funcționale. Dozarea

activității enzimelor serice dă informații precise asupra organelor lezate, în asemenea situații fiind mai greu de stabilit diagnosticul.

X.1.2. Enzimoterapia

Dat fiind rolul central pe care îl joacă enzimele în procesele biologice, este indiscutabil faptul că modificarea activității acestora determină în mod direct evoluția unor afecțiuni grave. Existența ***deficiențelor enzimatice congenitale și secundare*** ca urmare a unor leziuni și/sau anomalii la nivelul organelor unde se sintetizează enzimele respective a determinat declanșarea unor cercetări privind posibilitatea utilizării enzimelor în scop terapeutic, cercetări ale căror rezultate nu s-au lăsat așteptate. A devenit astfel posibilă distrugerea pe cale enzimatică a unor ***substanțe patologice*** cum se întâmplă în tratamentul trombolitic sau a ***metaboliților esențiali ai unor procese patologice*** pe care se bazează tratamentele cu asparaginază. Mai pot fi influențate în mod favorabil afecțiunile determinate de ***activitatea excesivă*** a unor enzime prin administrarea inhibitorilor enzimatici specifici.

Cu toate acestea, enzimoterapia are însă limite de aplicabilitate. Majoritatea enzimelor utilizare în scop terapeutic prin administrare orală pot fi distruse sub acțiunea proteolitică a enzimelor digestive fapt ce limitează foarte mult administrarea pe cale bucală. Pe de altă parte, efectele imune limitează administrarea parenterală deoarece preparatele de origine umană rareori sunt disponibile în cantități suficiente.

În majoritatea cazurilor este redusă posibilitatea utilizării enzimelor de origine microbiană, vegetală sau animală care exercită o acțiune antigenică la om. Fiind macromolecule, enzimele nu pot traversa decât rareori barierele membranare. Din această cauză, diferite afecțiuni congenitale enzimatice nu sunt accesibile enzimoterapiei decât în măsura în care substratul patologic al reacției blocate este exportat în fluidul interstițial. Imensa majoritate a enzimelor „medicament" aparțin clasei hidrolazelor și sunt utilizate în prezent în principal în ***afecțiuni digestive, afecțiuni ale sistemului de coagulare sanguină*** și ***fibrinoliză***.

a) ***Tratamentul enzimatic al afecțiunilor digestive.*** Majoritatea substanțelor nutritive nu poate fi utilizată sub forma în care acestea se află în alimente. Acești nutrienți sunt supuși procesului de digestie prin care sunt scindați hidrolitic, sub acțiunea enzimelor tractului digestiv, în compuși solu-

bili ce pot fi absorbiți la nivel intestinal. În urma acțiunii acestor hidrolaze se formează monozaharide, aminoacizi, acizi grași și glicerol care, după traversarea peretelui intestinal, sunt vehiculați pe cale sanguină în ficat. Acesta consumă 20-25 % din energia substanțelor nutritive pentru realizarea căilor metabolice ce au loc în hepatocite. O digestie eficientă reprezintă o condiție absolut indispensabilă unei activități hepatice normale realizându-se astfel o interdependență armonioasă a proceselor mecanice reflexe care acționează parțial pe cale nervoasă și, parțial, pe cale umorală.

Zilnic se formează în organism aproximativ 10 litri de sucuri digestive (salivă, suc gastric, secreții intestinale și pancreatice, bilă etc.) care sunt deversate în tractul digestiv. Acestea conțin aproximativ 10 grame de proteine-enzime utilizate zilnic pentru digestia substanțelor nutritive. În general, cantitatea de enzime sintetizate zilnic este superioară necesităților cotidiene. De exemplu, cele aproximativ 1,6 g amilaze sunt suficiente teoretic pentru degradarea a 175 Kg de amidon, adică o cantitate net superioară aportului alimentar zilnic.

În aceste condiții, factorul limitant al digestiei îl reprezintă capacitatea de resorbție la nivel intestinal. Capacitatea de digestie a lipidelor alimentare nu este însă la fel de mare ca în cazul glucidelor și proteinelor, din care cauză ea este supusă cel mai adesea degradărilor și este extrem de sensibilă în insuficiența pancreatică. Se observă, de exemplu, ***steatoree*** atunci când secreția de ***lipază*** este diminuată cu 20-25 %. La persoanele cărora li s-a efectuat pancreatectomie dintr-un motiv sau altul, activitatea enzimatică digestivă se situează la un nivel extrem de scăzut, fiind asigurată atât de enzimele gastrice cât și cele microbiene produse de flora intestinală. Numeroase studii efectuate pe asemenea subiecți au demonstrat că enzimoterapia substitutivă dă rezultate notabile.

Preparatele enzimatice utilizate în acest scop conțin ***proteinaze***, ***lipaze*** și ***amilaze*** de origine animală, vegetală și/sau microbiană. În diferite afecțiuni gastrice manifestate prin hipoaciditate și insuficiență peptică se utilizează preparate pe bază de ***pepsină*** care au o dublă funcție: completarea necesarului enzimatic și corectează aciditatea gastrică.

Dat fiind faptul că majoritatea afecțiunilor digestive sunt localizate la nivel intestinal, deseori se folosesc preparate enzimatice sub formă de ***pancreatină*** care este o pudră obținută prin deshidratarea și degresarea menajată a pancreasului de porc. Uneori, pancreatina se administrează în asociere cu

bilă deshidratată care manifestă acțiune coleretică. Fiind inactivate de mediul puternic acid și de pepsina gastrică, aceste preparate sunt deseori încapsulate în membrane polimerice rezistente în mediu acid dar solubile în mediu neutru și slab alcalin.

b) ***Coagularea sanguină și fibrinoliza***

Realizările practice ale biochimiei moderne au determinat, printre altele, progrese importante și în domeniul cunoștințelor noastre privind coagularea sanguină și fibrinoliza. Aceste progrese nu au permis doar înțelegerea mecanismului coagulării și al sistemului antagonist al fibrinolizei ci au deschis noi perspective în enzimologie.

Factorii activi implicați în aceste procese complexe sunt enzime ce catalizează reacții specifice. Inhibitorii lor, care sunt tot de natură proteică, îndeplinesc funcții de reglare, asigurând echilibrul între aceste două sisteme antagonice. În esență, coagularea sanguină constă în transformarea fibrinogenului solubil în fibrină insolubilă înalt polimerizată. Fibrinoliza este procesul invers, de degradare proteolitică a fibrinei cu formare de polipeptide solubile. Fibrina se formează constant în cantități minime la nivelul peretelui vascular intact, într-un proces lent de coagulare și se scindează, de asemenea, continuu, într-o fibrinoliză lentă (fig. 157).

Din punct de vedere enzimatic, coagularea sanguină și fibrinoliza sunt de fapt două etape de degradare proteolitică a fibrinogenului. Atunci când echilibrul fiziologic stabilit între coagulare și fibrinoliză se deplasează într-un sens sau în altul, apar hemoragii, respectiv tromboze. În asemenea cazuri este pe deplin justificată o enzimoterapie substitutivă în sensul activării sau al inhibiției după caz. ***Trombina*** (factorul IIa) este o proteinază înalt specifică ce poate fi aplicată local în stoparea hemoragiilor (de exemplu la nivelul plăgilor postoperatorii), sub forma unui preparat extras din sângele de bou. Această aplicație locală este posibilă și în hemoragia gastrică. Trombina nu poate fi însă injectată intravenos sau intramuscular, putând genera tromboze și embolie deoarece nu este neutralizată decât foarte lent de către inhibitorii plasmatici endogeni. În asemenea situații se folosește **accelerin-convertina** care este un amestec ce conține factorii VIIa (convertina), V (*accelerina*), IX (factorul *Christmas*) și X (factorul *Stuart-Prower*). Acest preparat activează protrombina (factorul I).

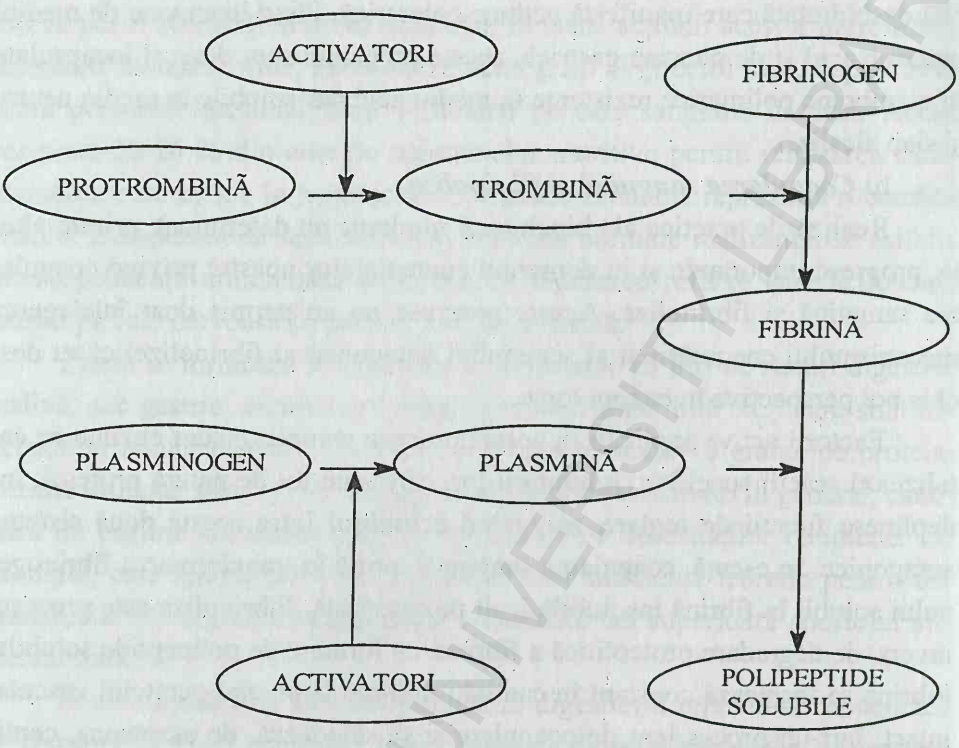


Fig. 157. Reprezentarea schematică a mecanismului coagulării sanguine şi fibrinolizei

În ***hemofilia A***, o maladie congenitală sanguină destul de frecventă, este absent factorul VIII - globulina antihemofilică A, o β_2-globulină cu masă moleculară mare. Un tratament de substituție este posibil prin perfuzarea de plasmă sanguină umană.

Anticoagulanții utilizați în tratamentul dereglărilor de coagulare acționează fie direct asupra factorilor coagulării (cum acționează heparina) fie indirect, când intervin în biosinteza acestor factori (ca în cazul cumarinelor şi indandionei). Dacă anticoagulanții pot fi utilizați în prevenirea trombozelor, tratamentul trombozelor deja constituite se face exclusiv prin enzimoterapie. Deoarece trombele sunt constituite în principal din fibrină, tromboliza poate fi provocată de enzime proteolitice specifice.

Plasmina poate fi utilizată în acest scop dar sunt necesare doze mari care pot deplasa echilibrul hemostatic deoarece această proteinază nu degradează doar fibrina ci şi fibrinogenul, precum şi factorii V şi VII. Din aceste mo-

BCU "VASILE PÂRVAN" UNIVERSITY LIBRARY

tive sunt preferați activatorii plasminogenului prin care se realizează distrugerea trobelor „din interior". Un activator ideal este ***urokinaza*** ce poate fi obținută din urina umană şi care nu prezintă proprietăți antigenice. Utilizarea clinică este însă limitată de cantitățile insuficiente datorate prețului foarte mare (sunt necesare cantități uriaşe de urină din care urokinaza se purifică prin metode complexe, fiind o enzimă foarte labilă).

O altă enzimă utilizată în acest scop este streptokinaza produsă de streptococul β-hemolitic. Această enzimă a fost administrată, printre altele şi în infarctul de miocard. Mecanismul de acțiune diferă de cel al urokinazei prin faptul că un „proactivator" care nu există în sângele uman este transformat într-un activator al plasminogenului. Unul din inconvenientele streptokinazei este efectul său imunogen şi apariția de anticorpi circulanți capabili să neutralizeze preparatul la repetarea tratamentului.

X.1.3 Enzimele în pediatrie

Şi în pediatrie, dozarea activității enzimelor dă indicații prețioase asupra diagnosticului şi evoluției proceselor metabolice patologice. Multe afecțiuni, unele din ele letale, pot fi astăzi decelate şi tratate în consecință.

Cel mai adesea, se determină activitatea fosfatazei alcaline, glutamat-dehidrogenazei, α-hidroxibutirat-dehidrogenazei, aspartatamino-transferazei (TGO), alaninamino-transferazei (TGP) etc. Astfel, în hepatita acută, activitatea celor două transaminaze este crescută chiar în faza prodromală, atinge maximum în faza icterică şi se normalizează progresiv în timpul convalescenței. Dozările enzimatice sunt la fel de importante şi în cazul afecțiunilor pancreasului.

În pancreatitele acute de exemplu, activitatea amilazică este de aproximativ 3 ori mai mare comparativ cu valoarea normală, deşi se întâlnesc şi valori de până la 40 de ori mai mari. Creşterea activității enzimatice este decelată deja după 3-6 ore de la debutul bolii şi atinge valoarea maximă după 20-30 ore. Se mai fac dozări enzimatice şi în icterul hemolitic (glucozo-6-fosfat-dehidrogenaza şi piruvat-kinaza eritrocitară), distrofia musculară (aldolaza şi creatin-kinaza), rahitismul florid (fosfataza alcalină), boala Gaucher (fosfataza acidă) etc.

X.1.4 Enzimele în oncologie

Terapeutica anticanceroasă a cunoscut un impuls important când s-a observat că serul de cobai posedă activitate antitumorală. Acest fenomen constă în degradarea L-asparaginei sub acțiunea asparaginazei din ser cu efecte letale asupra celulelor tumorale, în special leucemice. Enzimoterapia leucozelor nu este realizabilă actualmente decât cu ajutorul asparaginazei extrasă din *Escherichia coli*. Au fost purificate două asparaginaze, A și B, identice imunologic, dar distincte prin punctul lor izoelectric. Aceste două enzime posedă aceeași activitate catalitică și au aceeași masă moleculară (130 kDa) dar se deosebesc prin perioada de înjumătățire. L-asparaginaza A este principiul activ al preparatului farmaceutic cunoscut sub denumirea comercială de ***Crasnitine***. Acest preparat a dat rezultate bune în leucemiile limfoblastice acute la copii. Această afecțiune răspunde relativ bine și la chimioterapie, tendința actuală fiind de a asocia L-asparaginaza cu chimioterapia.

După cum au demonstrat experiențele pe animale și observațiile clinice asupra efectelor secundare, o întreagă serie de celule normale necesită asparaginază exogenă într-o măsură mai mare sau mai mică. Cercetări de mare anvergură asupra acestor aspecte au permis jalonarea unui principiu pentru cercetările viitoare asupra enzimelor ce catabolizează aminoacizii, alții decât asparagina. În urmă cu câțiva ani s-a propus experimentarea preparatelor de arginază în oncologie deoarece arginina stimulează creșterea unor tumori. În unele laboratoare se experimentează L-glutaminaza, rezultatele nefiind deocamdată concludente.

X.1.5. Noțiuni generale asupra metodelor imunoenzimatice de analiză

X.1.5.1. Generalități

Metodele imunologice sunt, în spwecial, cantitative și se bazează pe reacțiile antigen-anticorp. Actualmente, majoritatea metodelor de imunoanaliză utilizează și un al treilea element, așa-numitul ***trasor***. Acesta rezultă prin asocierea antigenului sau anticorpului cu un marker.

Era metodelor imunologice de analiză a debutat în 1959 când *Yalow & Berson* dozează insulina. În perioada următoare, cercetările în acest domeniu au fost considerabil lărgite, ceea ce a determinat apariția a numeroase modificări menite să mărească exactitatea și reproductibilitatea rezultatelor.

Progresele înregistrate în imunologie au permis, în primul rând, posibilitatea obținerii de anticorpi policlonali specifici atât pentru biomoleculele micromoleculare cât și pentru cele cu masă moleculară mare. Specificitatea și sensibilitatea anticorpilor au fost considerabil mărite în urma obținerii anticorpilor monoclonali de către *Köhler & Milstein* în 1975.

Rezultatele încurajatoare obținute în cercetările privind separarea, purificarea și conservarea diferitelor biomolecule au avut drept rezultat obținerea de etaloane de o calitate deosebită. Mărirea numărului acestora a determinat Organizația Mondială a Sănătății să pună la punct un sistem de standardizare internațională astfel încât astăzi, un mare număr de biomolecule posedă etaloanele sale specifice.

Un moment important în studiul acestor metode de analiză l-a reprezentat obținerea de noi markeri. Timp îndelungat s-au utilizat doar markerii radioactivi. Avantajul acestora constă în proprietățile de emisie care nu depind de natura fizico-chimică a mediului și în capacitatea de a fi detectați ușor și cu mare exactitate. Utilizarea markerilor radioactivi prezintă însă și unele inconveniente, principalul dezavantaj constând în posibilitatea folosirii limitate a elementelor radioactive în condițiile laboratoarelor obișnuite de enzimologie. Din aceste motive, în anii '60 ai secolului XX au început să fie utilizați alți markeri, cei mai importanți fiind cei enzimatici și cei luminiscenți.

X.1.5.2. Noțiuni generale privind structura chimică și rolul biologic al anticorpilor

Este cunoscut faptul că atunci când unui animal de experiență îi este injectat un antigen, răspunsul imunitar determină, printre altele, secreția de anticorpi. Anticorpii (imunoglobulinele) sunt glicoproteine sintetizate în limfocitele B (activate sub formă de plasmocite) și exportați în plasma sanguină și lichidul interstițial. Imunoglobulinele conțin situsuri speciale numite ***epitopi*** capabile să recunoască specific antigenele.

Structura chimică a anticorpilor a fost clarificată în urma unor studii asupra imunoglobulinelor provenite de la o clonă de celule mielomatoase (*Edelman; G. M.* – 1973). Conform acestor studii, imunoglobulinele conțin în moleculă așa-numitele catene grele H (*heavy*) și respectiv catene ușoare L (*light*) (fig. 158).

Catenele H sunt unite între ele prin intermediul a minimum două punți disulfidice intercatenare în timp ce fiecare catenă de tip L se leagă de câte o catenă H printr-o punte disulfidică. Se cunosc mai multe catene de tip H notate convențional γ, α, μ, δ și ε care stau la baza clasificării imunoglobulinelor - IgG, IgA, IgM, IgD și respectiv IgE (*Bach, J. F.* – 1986). La rândul lor, catenele L sunt de două tipuri (κ și λ) în funcție de capacitatea lor antigenică. Schema redată în figura 157 corespunde imunoglobulinelor G (IgG) ce conțin două catene de tip H și două de tip L și au masa moleculară de 150 kDa. Molecula acestora poate fi scindată enzimatic cu formarea mai multor fragmente. În 1959, *Porter R. R.* reușește să scindeze molecula de IgG cu ajutorul papainei în prezență de cisteină cu obținerea a trei fragmente: unul notat cu **Fc** (fragment cristalizabil din mediu apos) cu masa moleculară de 50 kDa și altele două identice notate **Fab** (*fragment antigen bindig*) cu masele moleculare de câte 45 kDa. Fiecare din cele două fragmente Fab poate interacționa cu antigenul specific.

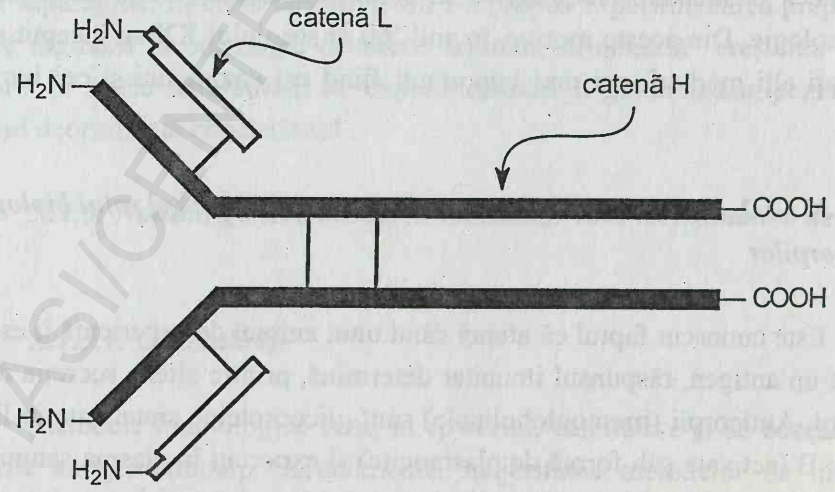


Fig. 158. Reprezentarea schematică a structurii imunoglobulinelor (Edelman, G. M. – 1973)

Un an mai târziu (*Nisonoff, A.* et al. – 1960) s-a reuşit scindarea imunoglobulinelor G sub acţiunea pepsinei cu obţinerea mai multor peptide şi a unui fragment $F(ab)_2$ ce conţine două situsuri de legare a antigenelor. Prin reducere, dimerul $F(ab)_2$ generează cele două fragmente Fab ce îşi conservă capacitatea de a interacţiona cu antigenele specifice.

Fiecare catenă peptidică din structura acestor fragmente conţine câte un domeniu constant şi unul variabil, structura acestuia din urmă depinzând de tipul imunoglobulinei din care provine. Zonele variabile interesează secvenţele de aminoacizi de la extremităţile N-terminale ale catenelor de tip H şi respectiv L, restul structurii primare rămânând nemodificat. Zonele variabile au fost notate cu V_L pentru catenele uşoare şi respectiv V_H pentru cele grele, iar domeniile constante au fost notate cu C_L şi respectiv C_H. La rândul lor, domeniile constante ale catenelor H conţin trei regiuni notate C_{H1}, C_{H2} şi respectiv C_{H3} (fig. 159).

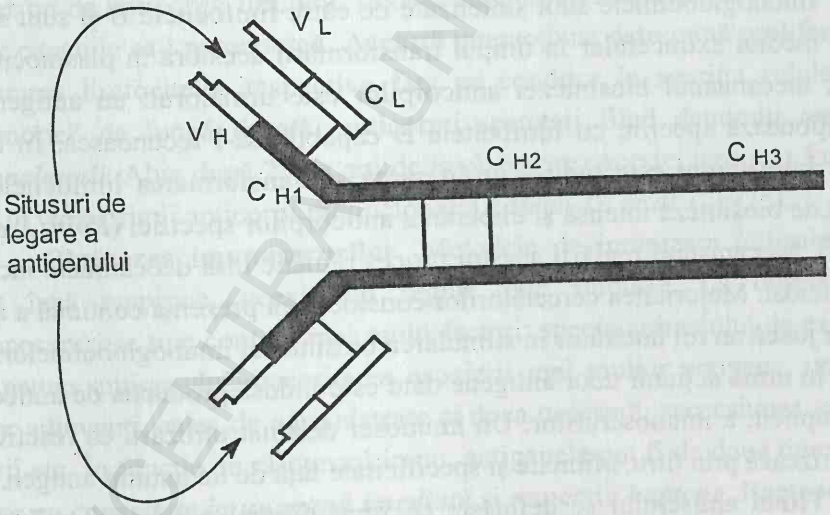


Fig. 159. Structura de bază a IgG (Nisonoff, A. et al. – 1960)

Imunoglobulinele cunoscute în prezent au fost împărţite în cinci clase în funcţie de structura catenelor lor de tip H: IgG, IgA, IgM, IgD şi IgE.

Imunoglobulinele G (IgG) reprezintă aproximativ 75% din totalul imunoglobulinelor din sistemul circulator, au o masă moleculară de 150 kDa şi o constantă de sedimentare de 7,5 S. la rândul lor, IgG se împart în patru

subclase în funcție de natura și ponderea componentei glucidice a catenelor H: IgG_1, IgG_2, IgG_3 și respectiv IgG_4. Pentru organismul uman, toate imunoglobulinele G, cu excepția IgG_3, au capacitatea de a forma complecși insolubili cu proteina A din peretele celular al *Staphylococcus aureus*.

Imunoglobulinele M (IgM) au masa moleculară de 900 kDa și sunt alcătuite din cinci subunități. Ele conțin în moleculă zece situsuri de legare a antigenelor deși, din motive sterice, nu toate sunt funcționale.

Imunoglobuliele A (IgA) au masa moleculară de 380 kDa și constanta de sedimentare de 11 S, fiind prezente preponderent în salivă, lapte, secrețiile genito-urinare etc.

Imunoglobulinele D (IgD) au o masă moleculară de 175 kDa și se găsesc în cantitate mare în membranele limfocitelor B sin sânge.

În fine, **imunoglobulinele E** (IgE) au masa moleculară de 190 kDa și sunt responsabile de reacțiile anafilactice ce determină eliberarea de histamină.

Imunoglobulinele sunt sintetizate de către limfocitele B și sunt secretate în mediul extracelular în timpul transformării acestora în plasmocite. În esență, mecanismul biosintezei anticorpilor este următorul: un antigen dat interacționează specific cu limfocitele B capabile să-l recunoască. În urma acestei interacțiuni este indusă proliferarea și transformarea limfocitelor B urmată de biosinteza intensă și eliberarea anticorpilor specifici (*Roitt, I. et al.* – 1985). Mecanismul reglării acestui proces rămâne însă deocamdată incomplet elucidat. Majoritatea cercetătorilor consideră că prezența continuă a antigenelor joacă un rol hotărâtor în stimularea biosintezei imunoglobulinelor.

În urma acțiunii unor antigene date este indusă producția de anticorpi deci, implicit, a imunoserurilor. Un imunoser destinat utilizării ca reactiv se caracterizează prin titru, afinitate și specificitate față de un anumit antigen.

Titrul antiserului se definește ca fiind diluția la care se realizează legarea a 50% dintr-un antigen marcat și are drept unitate de măsură inversul factorului de diluție.

Afinitatea unui imunoser se evaluează prin determinarea constantei de asociere K_a la echilibru și se exprimă în mol^{-1}.

Specificitatea unui imunoser față de un anumit antigen se definește ca fiind capacitatea sa de a recunoaște numai antigenul respectiv.

În prezent se obțin imunoseruri ce conțin mai multe tipuri de anticorpi care recunosc epitopi diferiți ai antigenelor. În afară de aceasta, mediul de

incubare poate conține o serie de specii moleculare ce prezintă o oarecare analogie structurală cu antigenele. Toate acestea fac ca în mediul de incubare să se producă așa-numitele **reacții încrucișate** în sensul că imunoserul poate interacționa și cu o serie de specii moleculare, altele decât antigenele. Metodele folosite astăzi permit însă evaluarea aceste „non-specificități" și a raportului dintre concentrația antigenului și concentrația speciilor moleculare ce interferă.

Anticorpi policlonali. Imunoserurile utilizate în imunoanaliză sunt seruri ce conțin cantități mari ale mai multor anticorpi care manifestă specificitate față de diferiți epitopi ai aceluiași antigen, adică sunt seruri policlonale. Prin extrapolare, anticorpii conținuți într-un astfel de imunoser poartă numele de ***anticorpi policlonali.***

Anticorpi monoclonali. Încă din 1950, *Mac Farlane Burnet* a elaborat o teorie asupra selecției clonale conform căreia fiecare limfocit B recunoaște un singur determinant antigenic, ceea ce înseamnă că sintetizează un singur tip de anticorpi. Implicit, fiecare antigen va interacționa numai cu celulele capabile să-l recunoască. Această interacțiune determină proliferarea și maturarea limfocitelor respective fapt ce conduce la apariția celulelor cu „memorie" de lungă durată, anticorpii secretați fiind denumiți ***anticorpi monoclonali.*** Abia după 25 de ani de la elaborarea acestei teorii au fost obținuți *in vitro* primii anticorpi monoclonali (*Köhler, G. et al.* – 1975).

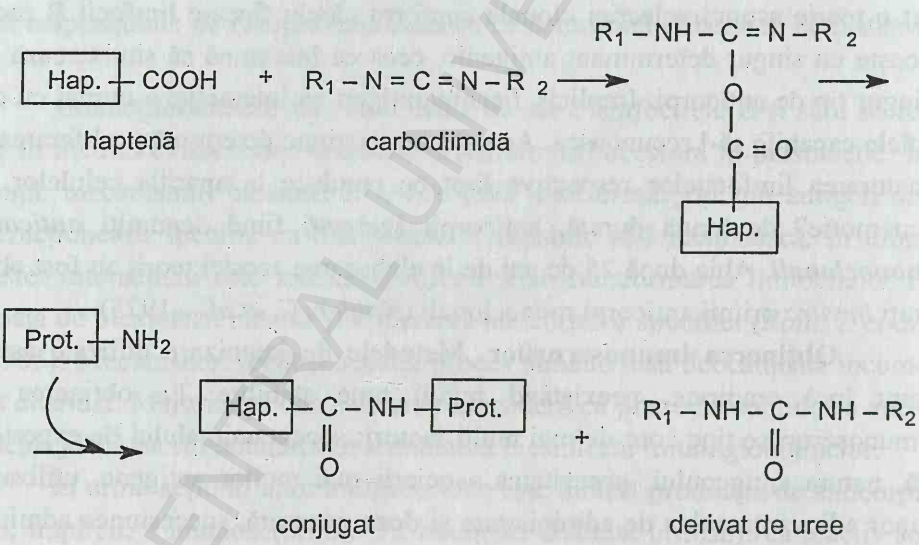
Obținerea imunoserurilor. Metodele de imunizare utilizate astăzi sunt încă empirice, neexistând reguli bine stabilite. La obținerea de imunoseruri se ține cont de mai mulți factori: specia animalului de experiență, natura antigenului, necesitatea asocierii mai multor antigene, utilizarea unor adjuvanți, calea de administrare și doza necesară, succesiunea administrării etc. În funcție de răspunsul imun, antigenele pot fi de două tipuri: ***antigene cu capacitate imunogenă imediată*** și respectiv ***haptene.*** Haptenele sunt specii moleculare (cu masă moleculară mică) ce nu prezintă capacitate imunogenă decât după cuplarea cu un „purtător" cu masă moleculară mai mare de 1000 Da.

Pentru ca o haptenă să poată fi fixată puternic, prin legare covalentă, pe un purtător este necesar ca ea să prezinte grupe funcționale complementare celor existente în molecula purtătorului. Dacă însă haptena nu posedă asemenea grupe funcționale, ea poate fi activată prin utilizarea unor tehnici de sinteză chimică organică. S-a mai constatat faptul că pentru obținerea de anti-

corpi cu specificitate înaltă este necesar ca fixarea haptenei să se facă prin formarea de legături covalente la care să participe 1 – 5 atomi de carbon.

În prezent, în calitate de purtător cel mai adesea se utilizează o serie de proteine cum ar fi albumina serică bovină şi tiroglobulina. Obţinerea unor astfel de complecşi se face, în general, în două etape: a) obţinerea unui derivat al haptenei şi b) legarea covalentă a acestuia de o proteină purtătoare cu ajutorul unui agent de cuplare. De regulă, agentul de cuplare este un compus bifuncţional. Una din grupele sale funcţionale reacţionează cu o grupare corespunzătoare din molecula haptenei (respectiv a derivatului său), iar cealaltă are rolul de a se lega covalent de proteina purtătoare. În prezent se folosesc cu succes mai multe metode de cuplare a haptenelor cu proteinele purtătoare.

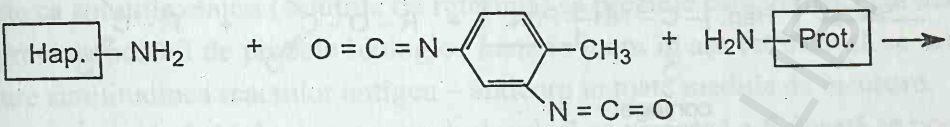
*a) **Cuplarea cu ajutorul carbodiimidei*** se face conform reacţiilor:



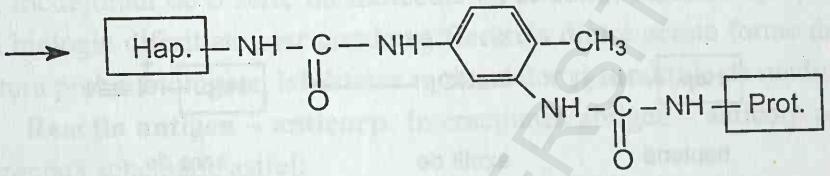
Dintre carbodiimidele solubile în apă, cel mai adesea se folosesc 1-ciclohexil-3(2-morfolinoetil)-carbodiimida-meto-p-toluen-sulfonatul (CMC) şi respectiv 1-etil-3(3-dimetil-aminopropil)-carbodiimida (EDAC), excesul de reactiv eliminându-se prin dializă. Această metodă se foloseşte preponderent la cuplarea peptidelor cu masă moleculară mică, a hormonilor, a unor medicamente, a AMP-ului ciclic etc.

b) Cuplarea cu ajutorul diizocianatului. Din această categorie de compuşi, cel mai adesea se foloseşte toluen-2,4-diizocianatul care este capa-

bil să lege două grupări aminice de la două molecule diferite conform reacției:



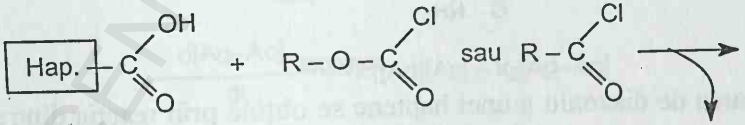
haptenă toluen-diizocianat



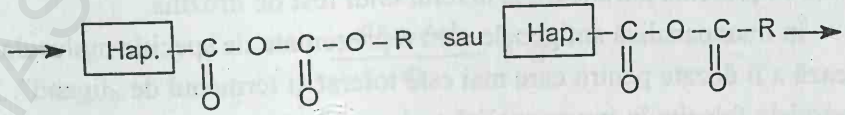
conjugat

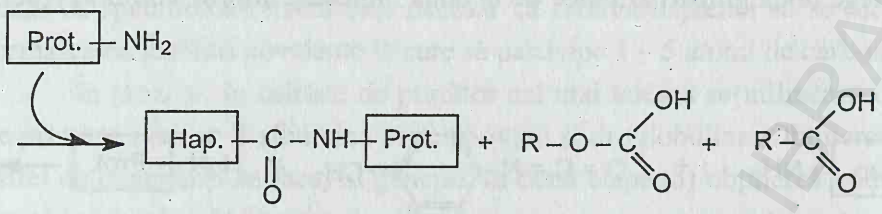
Această reacție poate fi realizată în două etape. În prima fază are loc reacția haptenei cu diizocianatul, pentru ca în faza a doua, după eliminarea excesului de reactiv, compusul format să interacționeze cu proteina purtătoare.

c) Cuplarea cu ajutorul anhidridei mixte. Într-o primă etapă se obține anhidrida mixtă prin reacția dintre un derivat hemisuccinic al haptenei și o clorură de acil, anhidrida obținută fiind stabilă în medii neapoase la temperaturi scăzute. În etapa următoare această anhidridă reacționează cu proteina purtătoare la nivelul unei grupări aminice libere a acesteia:

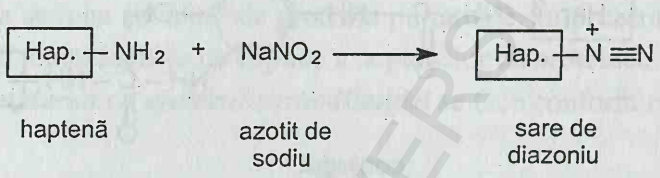


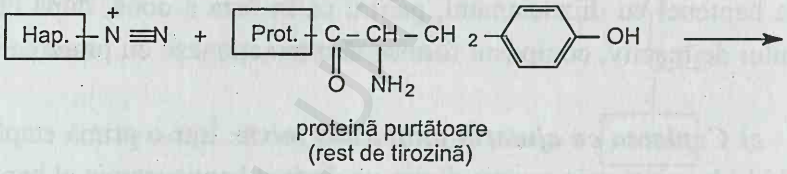
haptenă

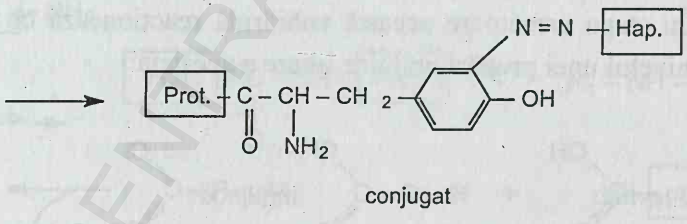




*d) **Cuplarea cu ajutorul sărurilor de diazoniu** se realizează conform următoarelor reacții:*







Sarea de diazoniu a unei haptene se obține prin reacția dintre azotitul de sodiu şi gruparea aminică a unei haptene în mediu acid, la temperaturi joase. În etapa următoare, această sare de diazoniu suferă o reacție de condensare cu proteina purtătoare la nivelul unui rest de tirozină.

În imunoanaliză antigenele sunt reprezentate de speciile moleculare ce urmează a fi dozate pentru care mai este tolerat şi termenul de „ligand". Toate metodele folosite în imunoanaliză se bazează pe reacțiile specifice antigen – anticorp. Aceste interacțiuni conduc la formarea unor legături cu configurații spațiale specifice. Evaluarea concentrației antigenului se face pe o curbă etalon trasată cu ajutorul unor soluții ale antigenului de concentrații cunoscu-

te (soluții etalon), extrapolând valoarea semnalului obținut pentru proba de analizat.

O condiție absolut indispensabilă obținerii de rezultate reproductibile este ca soluțiile etalon (soluțiile de referință) să prezinte caracteristici cât mai apropiate posibil de probele biologice luate în lucru în așa fel încât să se asigure similitudinea reacțiilor antigen – anticorp în toate mediile de incubare.

În probele biologice, specia moleculară ce urmează a fi dozată se poate afla sub mai multe forme: liberă, legată de diferite proteine, parțial metabolizată, înconjurată de o serie de molecule cu structuri chimice apropiate dar cu rol biologic diferit etc., iar ponderea fiecăreia dintre aceste forme depinde de natura probei biologice, labilitatea moleculelor și condițiile de mediu.

Reacția antigen – anticorp. Interacțiunea antigen – anticorp poate fi reprezentată schematic astfel:

$$Ag + Ac \underset{k_2}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} Ag-Ac$$

unde: Ag este antigenul liber, Ac este anticorpul liber, Ag–Ac reprezintă complexul antigen – anticorp, k_1 este constanta vitezei de asociere, iar k_2 cea a vitezei de disociere.

Conform acestei scheme, molecula unui antigen liber interacționează reversibil cu o moleculă a anticorpului specific. Starea de echilibru se instalează atunci când viteza de formare a complexului Ag–Ac devine egală cu viteza de disociere a acestui complex. Derivând în funcție de timp ecuația de mai sus obținem:

$$\frac{d[Ag-Ac]}{dt} = k_1[Ag][Ac] - k_2[Ag-Ac]$$

După instalarea stării de echilibru această derivată devine nulă:

$$\frac{d[Ag-Ac]}{dt} = O$$

Aceasta înseamnă că:

$$k_1[Ag][Ac] = k_2[Ag-Ac]$$

sau:

$$\frac{[Ag - Ac]}{[Ag][Ac]} = \frac{k_1}{k_2} = \text{const.} = k_a$$

unde k_a este constanta de asociere sau de afinitate la echilibru cunoscută şi sub numele de **constantă de afinitate intrinsecă.**

Constanta de disociere la echilibru se defineşte ca fiind:

$$k_d = \frac{k_2}{k_1} = \frac{1}{k_a}$$

Constantele k_a şi k_d nu depind de concentraţia antigenului şi anticorpului, în schimb sunt dependente de temperatura mediului de incubare şi de prezenţa în mediu a speciilor moleculare care interferă şi care şi au ca unităţi de măsură mol/litru pentru k_d şi respectiv litru/mol pentru k_a.

Dacă notăm convenţional cu **F** concentraţia antigenului liber şi cu **B** concentraţia complexului Ag – Ac se poate scrie:

$$k_a = \frac{B}{F[Ac]}$$

În orice moment al reacţiei, concentraţia anticorpilor liberi [Ac] este dată de diferenţa dintre concentraţia totală a anticorpilor intraţi în reacţie şi concentraţia anticorpilor aflaţi sub forma complexului Ag–Ac. Aceasta înseamnă că:

$$[Ac]_T = [Ac] + [Ag–Ac]$$

sau:

$$[Ac] = [Ac]_T - [Ag–Ac] = [Ac]_T - B$$

Ultima relaţie mai poate fi scrisă şi sub forma:

$$\frac{B}{F} = k_a([Ac]_T - B)$$

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Această relație demonstrează faptul că există o dependență liniară între raportul B/F și concentrația complexului antigen–anticorp. Reprezentarea grafică a lui B/F în funcție de B (graficul Scatchard) este o dreaptă cu panta $-k_a$ ce intersectează axa absciselor în punctul $[Ac]_T$ și axa ordonatelor în punctul $k_a[Ac]_T$ (fig. 160).

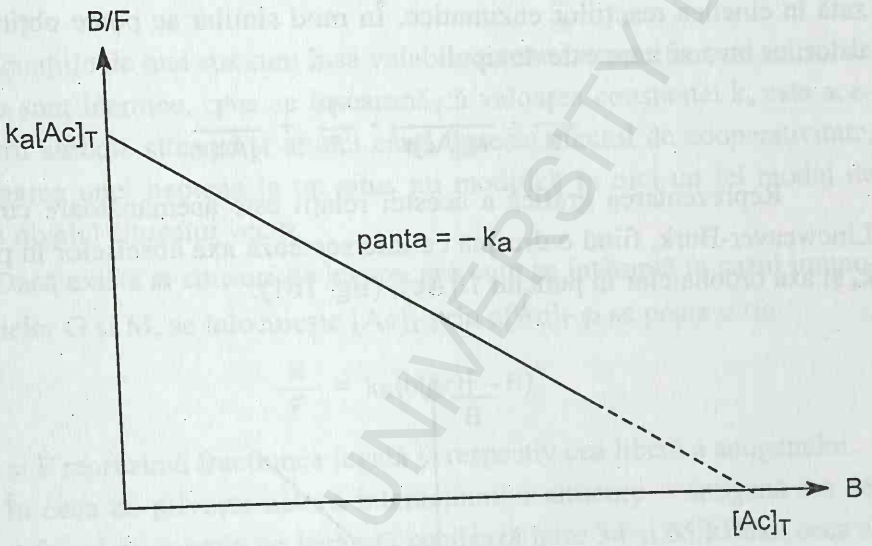


Fig. 160. Graficul Scatchard pentru cinetica interacțiunii antigen-anticorp (Barbier, Y. – 1989)

Prin rearanjarea termenilor din ultima relație se obține:

$$B = k_aF([Ac]_T - B) \Rightarrow$$

$$\Rightarrow B = k_aF[Ac]_T - k_aFB \Rightarrow$$

$$\Rightarrow B + k_aFB = k_aF[Ac]_T \Rightarrow$$

$$\Rightarrow B(1 + k_aF) = k_aF[Ac]_T$$

de unde:

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

$$B = \frac{k_a F[Ac]_T}{1 + k_a F}$$

Această relație este asemănătoare cu ecuația Michaelis-Menten utilizată în cinetica reacțiilor enzimatice. În mod similar se poate obține ecuația valorilor inverse care este de tipul:

$$\frac{1}{B} = \frac{1}{k_a[Ac]_T} \cdot \frac{1}{F} + \frac{1}{[Ac]_T}$$

Reprezentarea grafică a acestei relații este asemănătoare cu graficul Lineweaver-Burk, fiind o dreaptă ce intersectează axa absciselor în punctul $-k_a$ și axa ordonatelor în punctul $1/[Ac]_T$ (fig. 161).

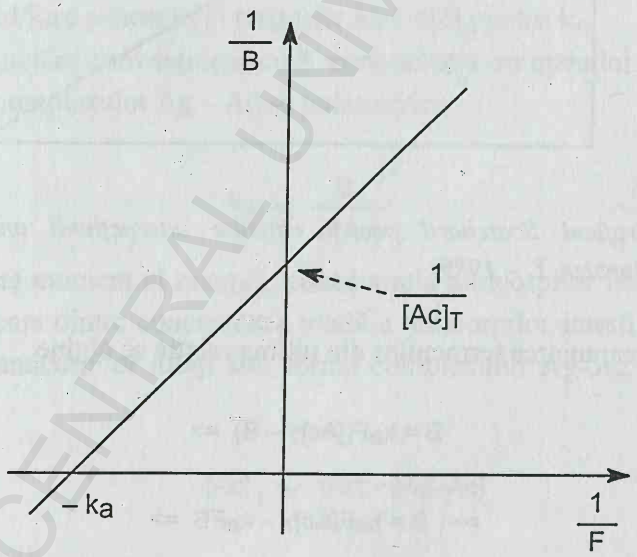


Fig. 161. Graficul Lineweaver-Burk pentru interacțiunea antigen–anticorp (Barbier, Y. – 1989)

În mod similar cu cinetica reacțiilor enzimatice, cu ajutorul ultimelor două relații se pot determina experimental parametrii k_a și $[Ac]_T$. Toate raționamentele matematice au fost făcute pentru cazul cel mai simplu al interacțiunii dintre o singură moleculă de antigen și una de anticorp. În realitate, la

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

această interacțiune participă simultan o multitudine de specii moleculare aparținând celor doi parametri (antigene și anticorpi). În afară de aceasta, cu excepția haptenelor monovalente, antigenele prezintă deseori mai mulți epitopi (antigene multivalente). Anticorpii utilizați sunt, în marea lor majoritate, imunoglobuline G ce conțin două situsuri de legare. De asemenea, un anticorp, chiar și monoclonal, poate lega la rândul lui două haptene monovalente.

Ecuațiile de mai sus sunt însă valabile numai în cazul în care situsurile de legare sunt identice, ceea ce înseamnă că valoarea constantei k_a este aceiași pentru ambele situsuri și atunci când lipsește efectul de cooperativitate, adică legarea unei haptene la un situs nu modifică în nici un fel modul de legare la nivelul situsului vecin.

Dacă există **n** situsuri de legare, așa cum se întâmplă în cazul imunoglobulinelor G și M, se înlocuiește $[Ac]_T$ prin $n[Ac]_T$ și se poate scrie:

$$\frac{B}{F} = k_a(n[Ac]_T - B)$$

unde B și F reprezintă fracțiunea legată și respectiv cea liberă a antigenului.

În ceea ce privește natura interacțiunilor anticorp – antigenă s-a demonstrat faptul că energia de legătură oscilează între 34 și 65 kJ/mol ceea ce exclude ca aceste interacțiuni să fie legături de tip covalent pentru care energia de legătură oscilează între 200 și 500 kJ/mol. Anticorpii interacționează în mod specific cu antigenele prin legături slabe: legături ionice, interacțiuni de tip Van der Waals, punți de hidrogen și respectiv interacțiuni hidrofobe. Energia acestor legături oscilează între 4 – 30 kJ/mol în funcție de tipul legăturii. Între acestea, interacțiunile hidrofobe joacă un rol deosebit, ele reprezentând până la 50% din numărul total de interacțiuni.

X.1.5.3. Principiile generale ale metodelor imunologice de dozare

Cele mai importante metode de dozare care se bazează pe interacțiunea specifică anticorp – antigenă sunt metodele ce utilizează un marker specific (un izotop radioactiv, o enzimă, un luminofor etc.) din care cauză ele se clasifică în metode radio-imunologice, enzimo-imunologice (imunoenzi-matice), fluoro-imunologice ș.a. (*Wide, L. – 1983*).

BCU "MIHAIL KOGĂLNICEANU" LIBRARY

În funcție de raportul cantitativ dintre anticorpi şi antigene, aceste metode se împart în două mari grupe:

a) metode prin competiție sau metode cu deficit de anticorpi;

b) metode cu exces de anticorpi;

Din ultima categorie, cele mai cunoscute sunt metodele imunometrice de tip *sandwich*.

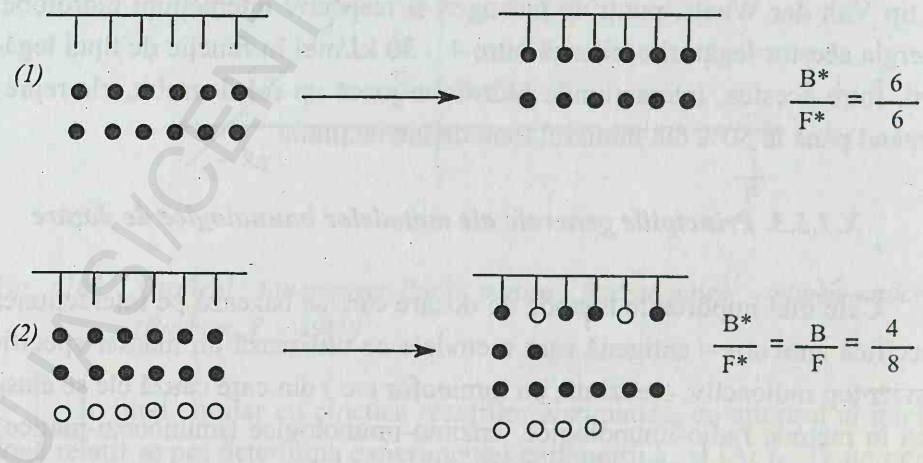
• ***Metode prin competiție***

În cadrul acestor metode, în mediul de incubare există trei specii moleculare distincte: antigenul (Ag), antigenul marcat (Ag*) şi anticorpii specifici acestor antigene (Ac). Atunci când concentrația anticorpilor este mai mică decât concentrația totală a antigenelor marcate se realizează condițiile necesare unei competiții față de situsurile de legare ale anticorpilor cu apariția complecşilor de tipul antigen – anticorp (Ag – Ac) şi respectiv antigen marcat – anticorp (Ag* – Ac) conform reacțiilor:

$$Ag + Ac \rightleftharpoons Ag - Ac$$

$$Ag^* + Ac \rightleftharpoons Ag^* - Ac$$

Dacă se menține constantă concentrația anticorpilor şi antigenelor marcate, o creştere a concentrației antigenelor libere determină o creştere a concentrației complecşilor Ag – Ac concomitent cu scăderea corespunzătoare a concentrației complecşilor Ag* – Ac (fig. 162).



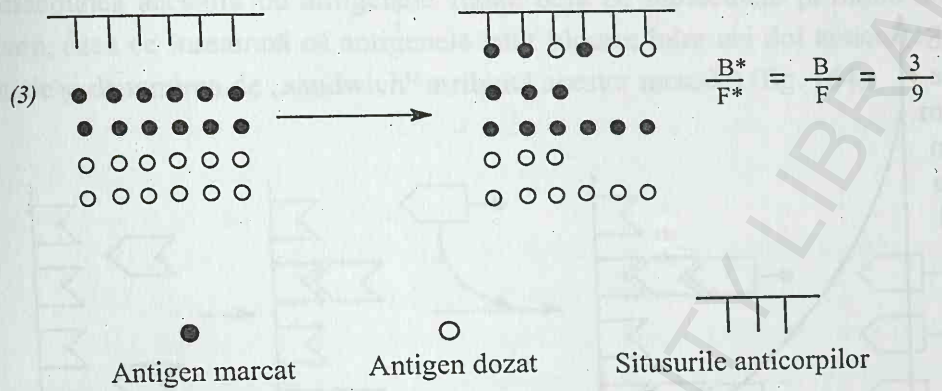


Fig. 162. Reprezentarea schematică a competiției între antigene și antigenele marcate față de situsurile de legare ale anticorpilor
(1) – în absența antigenelor stabile; (2) și (3) – în exces de anticorpi stabili; B – concentrația antigenelor marcate legate de anticorpi; F* – concentrația antigenelor marcate libere; B – concentrația antigenelor legate de anticorpi; F – concentrația antigenelor libere. (Wide, L. et al. – 1983)*

În cazul în care ar fi posibilă separarea speciilor moleculare libere de complecșii Ag – Ac și Ag* – Ac fără a fi afectat echilibrul reacției, s-ar putea determina ușor concentrația antigenului marcat liber (F*) precum și a complexului antigen marcat – anticorp (B*) corespunzătoare fiecărei concentrații a antigenelor. La echilibru, aceste concentrații se află în același raport existent între concentrațiile antigenelor libere (F) și legate (B). De aceea, pentru toate concentrațiile antigenelor este îndeplinită relația:

$$\frac{B}{F} = \frac{B^*}{F^*}$$

Pentru evaluarea concentrației unui antigen într-un mediu (lichid de analizat) se trasează o curbă de etalonare cu ajutorul unor soluții etalon de concentrații bine determinate (fig. 163).

Pe axa ordonatelor sunt trecute valorile intensității semnalului (activitate enzimatică, absorbanță, număr de impulsuri etc.) corespunzătoare concentrațiilor antigenului marcat liber (F*) sau legat (B*).

BCU MEDICINA - UNIVERSITY LIBRARY

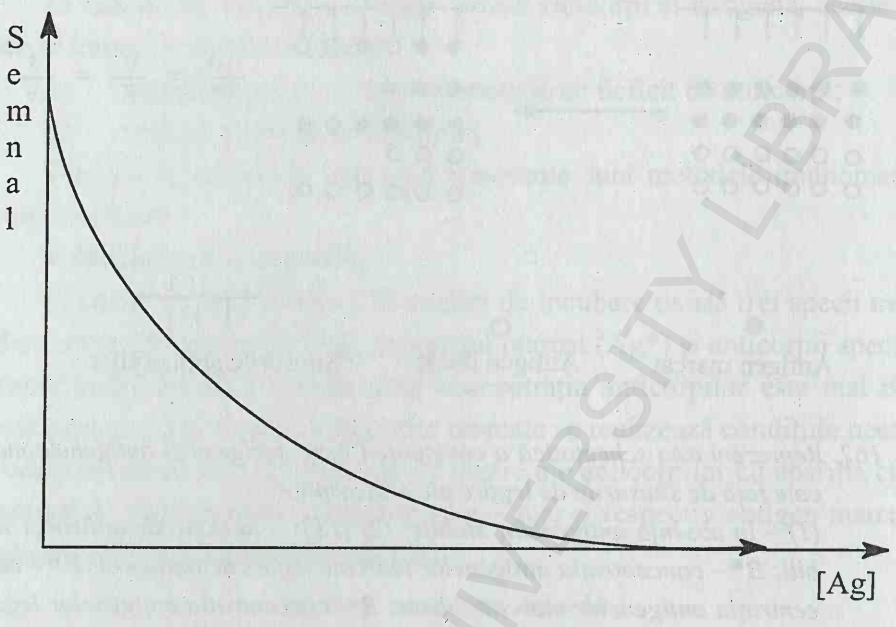


Fig. 163. Aspectul general al curbei de etalonare pentru metodele prin competiție (Barbier, Y. – 1989)

- ***Metodele imunometrice „sandwich"***

Aceste metode de analiză au cunoscut o amploare deosebită datorită utilizării anticorpilor monoclonali, iar în ultimul timp tind să înlocuiască din ce în ce mai mult metodele prin competiție. Metodele imunometrice sandwich se deosebesc de cele prin competiție prin utilizarea anticorpilor în exces precum şi prin utilizarea unui alt anticorp marcat în calitate de indicator al reacției dintre antigene şi primul tip de anticorpi (*Miles, L. E. M. et al.* – 1970).

Primul anticorp se fixează pe un suport solid, insolubil (sub formă de tuburi, sfere, particule neregulate etc.) într-o cantitate bine determinată în aşa fel încât numărul total de situsuri de legare să fie mai mare decât numărul de molecule de antigene din soluția etalon şi respectiv din lichidul biologic de analizat. În mediul de incubare, antigenele vor interacționa în mod specific la nivelul situsurilor de legare.

În momentul în care în mediul de incubare se adaugă anticorpi marcați (fie simultan cu antigenele în cazul *metodelor într-un timp*, fie ulterior, după o primă incubare şi spălare în cazul *metodelor în doi timpi*) are loc in-

teracțiunea acestora cu antigenele fixate deja pe moleculele primului anticorp, ceea ce înseamnă că antigenele sunt blocate între cei doi anticorpi (de unde şi denumirea de „sandwich" atribuită acestor metode) (fig. 164).

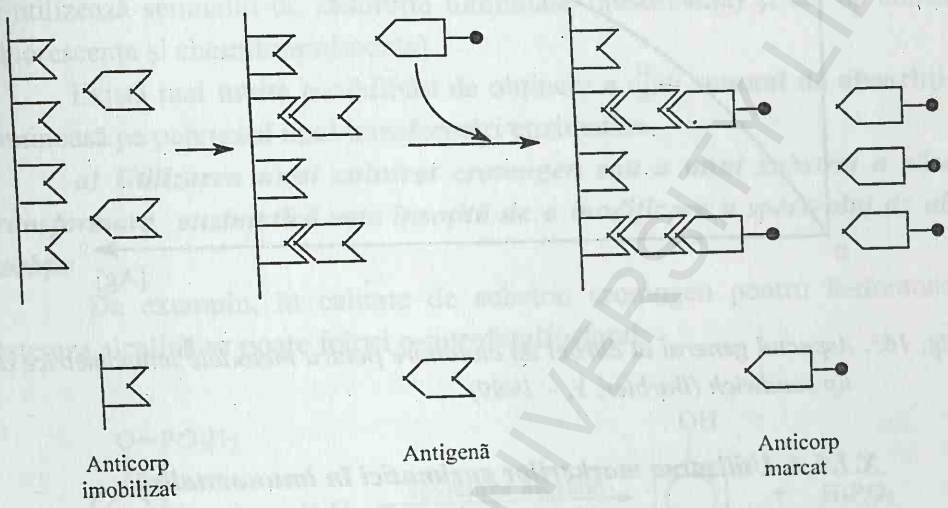


Fig. 164. Principiile generale ale metodelor imunometrice de tip sandwich (Miles, L. E. M. et al. – 1977)

După formarea interacțiunilor *anticorp imobilizat–antigenă–anticorp marcat*, aceşti complecşi se separă relativ uşor prin spălare. Alături de anticorpii imobilizați şi cei marcați mai pot fi utilizați atât anticorpii monovalenți cât şi anticorpii cu specificități diferite, acest lucru mărind interesul cercetătorilor față de anticorpii monoclonali specifici față de un singur epitop.

Trasarea curbei de etalonare se face trecând pe abscisă concentrația antigenelor, iar pe axa ordonatelor intensitatea semnalului complecşilor marcați Ac – Ag – Ac*, curba obținută fiind diferită de cea utilizată la metodele prin competiție (fig. 165).

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

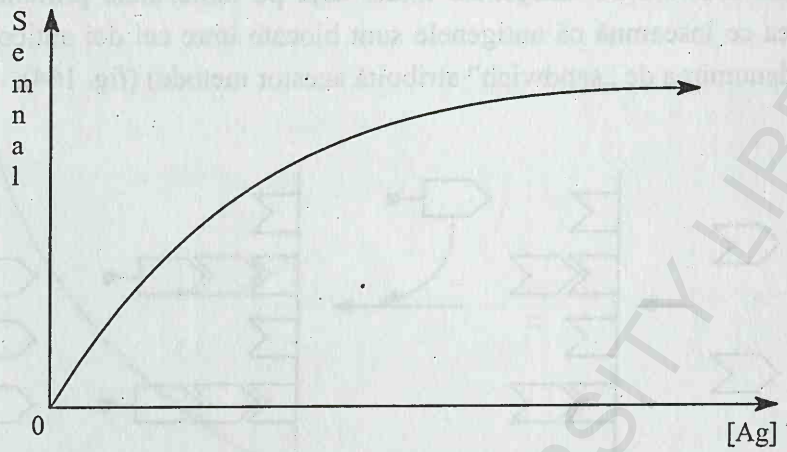


Fig. 165. Aspectul general al curbei de etalonare pentru metodele imunometrice de tip sandwich (Barbier, Y. – 1989)

X.1.5.4. Utilizarea markerilor enzimatici în imunoanaliză

Studiul metodelor imunoenzimatice de analiză a cunoscut o amploare deosebită în ultimele decenii datorită unor avantaje incontestabile față de metodele radioimunologice, fluoroimunologice şi alte metode care se bazează pe interacțiunea specifică anticorp – antigenă. Metodele imunoenzimatice utilizează în calitate de markeri diferite enzime, iar semnalul evaluat este reprezentat de activitatea catalitică a enzimei marker.

• ***Principiile de bază ale obținerii markerilor enzimatici***

Datorită existenței unei aparaturi de laborator moderne şi beneficiind de aportul anticorpilor monoclonali, metodele imunoenzimatice sunt cel puțin la fel de performante ca şi celelalte metode moderne de analiză cum ar fi cele radioimunologice, fluoro-imunologice etc.

Metodele imunoenzimatice de analiză se bazează pe realizarea unei transformări enzimatice specifice a unui substrat, după finalizarea reacției imunologice, cu formarea unei specii moleculare ce poate fi dozată spectrofotometric (prin absorbție sau prin emisie).

În metodele imunoenzimatice de analiză, fie enzima, fie substratul său, este marker pentru antigen sau pentru anticorp, fapt ce permite cuantificarea reacției imunologice. Această cuantificare este posibilă prin efectuarea reacției enzimatice respective.

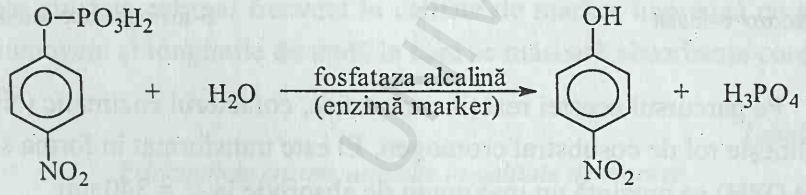
Modificările cantitative şi/sau calitative ale diferitelor specii moleculare din mediul de incubare conduc la obținerea unui semnal măsurabil care, în general, este direct proporțional cu activitatea enzimatică.

În evaluarea activității catalitice a unei enzime marker, cel mai adesea se utilizează semnalul de absorbție luminoasă (absorbanța) şi cel de emisie (fluorescența şi chemiluminiscența).

Există mai multe posibilități de obținere a unui **semnal de absorbție** luminoasă pe parcursul unei transformări enzimatice.

a) Utilizarea unui substrat cromogen sau a unui substrat a cărei transformare enzimatică este însoțită de o modificare a spectrului de absorbție

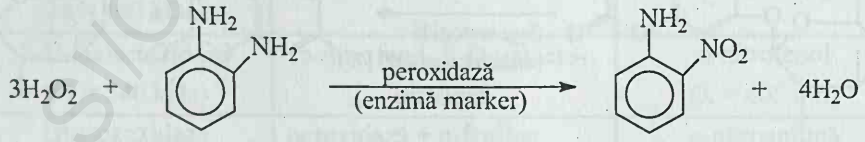
De exemplu, în calitate de substrat cromogen pentru fosfomonoesteraza alcalină se poate folosi p-nitrofenilfosfatul:



substrat cromogen produs cromogen

În această reacție, enzima transformă substratul cromogen într-un produs a cărei absorbție maximă se înregistrează la $\lambda = 405$ nm, lungime de undă diferită de cea la care absoarbe substratul.

b) Utilizarea unui substrat asociat cu un cromogen

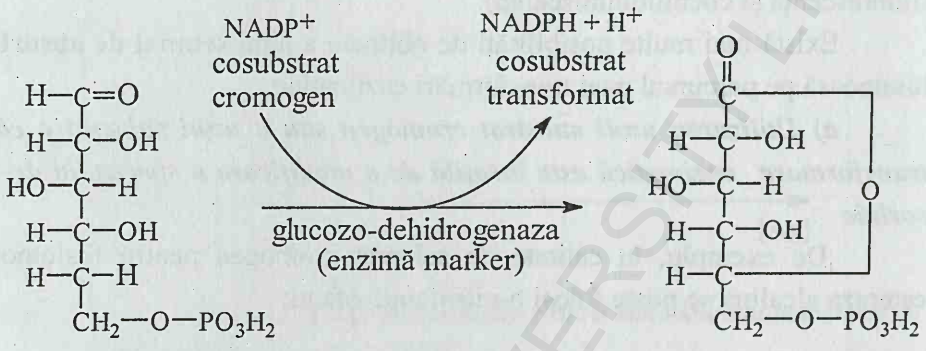


substrat cromogen asociat cromogen asociat transformat

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

În această reacție, peroxidaza catalizează oxidarea o-fenilendiaminei în o-nitroanilină cu ajutorul substratului (H_2O_2). Absorbția maximă a o-nitroanilinei se înregistrează la $\lambda = 492$ nm.

c) Utilizarea unui cosubstrat cromogen

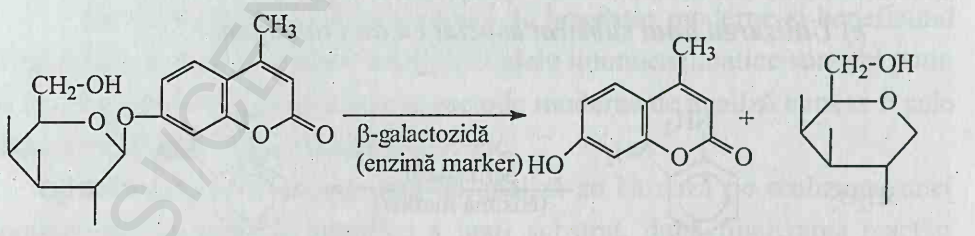


glucozo-6-fosfat 6-fosfoglucono-lactonă

Pe parcursul acestei reacții enzimatice, cofactorul enzimatic ($NADP^+$) îndeplinește rol de cosubstrat cromogen. El este transformat în forma sa redusă (NADPH) ce prezintă un maximum de absorbție la $\lambda = 340$ nm.

Și pentru obținerea unui **semnal de emisie** luminoasă există mai multe variante practice.

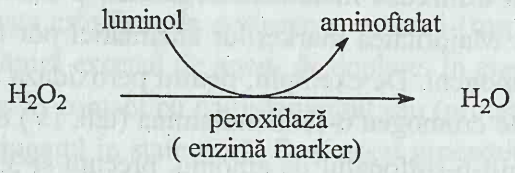
a) Utilizarea unui substrat fluorogen, adică a unui compus al cărui produs de transformare este fluorescent:



4-metil-umbeliferil-β-galactopiranoză 4-metil-umbeliferil β-galactopiranoză

Pe parcursul acestei reacții enzimatice, substratul suferă o scindare hidrolitică cu formare de 4-metil-umbeliferonă cu proprietăți fluorescente (cu maximum de excitație la $\lambda = 364$ nm și cel de emisie la $\lambda = 448$ nm).

b) Utilizarea unui substrat luminogen asociat:



În această reacție, substratul asociat (luminol) se oxidează cu formarea unui ion aminoftalat aflat într-o stare energetică excitată. Reconversia spontană a acestui ion în starea sa fundamentală este însoțită de o emisie luminoasă (lungimea de undă a maximului de emisie fiind $\lambda = 430$ nm).

• ***Enzime utilizate în imunoanaliză***

În metodele imunoenzimatice de analiză pot fi folosite diferite enzime, în funcție de metabolitul ce urmează a fi dozat. În tabelul XIII redăm enzimele utilizate cel mai frecvent în calitate de marker împreună cu principalii cromogeni și lungimile de undă la care se măsoară absorbanța corespunzătoare.

Tabelul XIII

Principalele enzime utilizate în calitate de marker

Enzima	Substratul cromogen sau substrat + cromogen	Produsul și lungimea de undă ce corespunde absorbției maxime
Peroxidaza (M = 40 kDa)	H_2O_2 + o-fenilendiamină	o-nitroanilină (l = 492 nm)
Fosfomonoesteraza alcalină (M = 140 kDa)	p-nitrofenil-fosfatul	p-nitrofenol ($\lambda = 405$ nm)
β-D-Galactozidaza (M = 540 kDa)	o-nitrofenil- β-D-galacto-piranoză	o-nitrofenol ($\lambda = 405$ nm)
Glucozoxidaza (M = 186 kDa)	peroxidază + o-fenilen diamină $\rightarrow H_2O_2$ glucoză + H_2O_2	o-nitroanilină ($\lambda = 492$ nm)
Glucozo-6-fosfat dehidrogenaza (M = 128 kDa)	glucozo-6-fosfat + + $NADP^+$ sau NAD^+	$NADPH + H^+$ sau $NADH + H^+$ ($\lambda = 340$ nm)

În afară de aceste enzime, consacrate deja pentru analiza imunoenzimatică, se mai utilizează malatdehidrogenaza, β-amilaza, fosfolipaza c, catalaza şi ureaza. Majoritatea markerilor enzimatici pot fi evaluaţi fotometric cu diferiţi cromogeni. De exemplu, pentru peroxidaza din hrean se poate utiliza în calitate de cromogen o-fenilendiamina (tab. IV) dar şi 2,2-azino-di-3-etil-benzotiazolinil-6-sulfonatul de amoniu, precum şi 3,3′, 5,5′-tetrametil-benzidina.

Pentru β-D-galactozidază, în afară de substratul cromogen (orto- şi para-nitrofenil- β-D-galactopiranoză) există şi un substrat fluorogen (4-metil-umbeliferil- β-D-galactopiranoză).

X.1.5.5. Tehnici de marcare

- *Generalităţi*

Marcarea constă în fixarea unei enzime prin legături covalente, fie de o proteină [cel mai adesea o imunoglobulină sau fragmentele sale F(ab)2 şi F(ab)] fie de o haptenă. Alegerea tehnicii de marcare se face în funcţie de unele criterii cum ar fi randamentul marcării, conservarea capacităţii de legare a imunoglobulinelor şi a situsului catalitic al enzimei, complexitatea procedurii experimentale şi stabilitatea legăturii formate în condiţiile fizico-chimice ale dozării imunoenzimatice propriu-zise şi în timp etc. Aceste cerinţe sunt însă uneori incompatibile între ele. De exemplu, un nivel prea înalt de marcare poate avea repercusiuni negative asupra conservării activităţii enzimatice.

Legarea enzimei de o haptenă depinde de reactivitatea acesteia din urmă şi, implicit, de structura sa chimică.

În cuplarea enzimei cu o proteină sunt implicate grupările aminice şi carboxilice libere, cele tiolice aparţinînd resturilor de cisteină şi, în cazul glicoproteinelor, resturile glucidice. Legarea se face cu ajutorul unui agent de cuplare (ligand) care este, de regulă, un reactiv bi- sau plurifuncţional.

Pentru realizarea marcării se folosesc două procedee principale. Una din tehnici constă în realizarea unui mediu de reacţie ce conţine enzima, proteina şi agentul de cuplare. Prin acest procedeu se obţine un produs de reacţie heterogen care, deseori, este greu de purificat.

Un alt procedeu (numit *"în două etape"* sau *"în doi timpi")* constă în realizarea unei reacții a agentului de cuplare cu enzima sau cu proteina într-o primă etapă. Aceasta este faza de *activare* a enzimei (respectiv proteinei) în urma căreia se înlătură excesul de agent de cuplare. În etapa a doua, compusul activat este pus în contact cu complementul său (proteina, respectiv enzima), obținînd conjugatul în stare pură. Deşi acest procedeu este mai complicat, fiind necesară izolarea compusului activat, fiecare etapă este controlabilă, iar produşii obținuți prezintă calități superioare (omogenitate, activitate etc.).

- ***Metode de cuplare***

Atunci când în procesul de cuplare sunt implicate grupările aminice libere ale resturilor de aminoacizi bazici din catenele polipeptidice este absolut obligatoriu ca mediul de reacție să nu conțină nici o specie moleculară capabilă să concureze cu agentul de cuplare pentru situsul de legare (printre aceste specii moleculare numărându-se în primul rând sulfatul de amoniu, tris-hidroxi-metil-aminometanul, glicocolul etc.).

Indiferent de tehnica utilizată (instantanee sau în doi timpi), cuplarea se poate realiza prin mai multe metode.

a) Cuplarea prin intermediul aldehidei glutarice. Glutaraldehida conține două grupări carbonilice ce pot reacționa cu grupe aminice libere din structura enzimei şi a imunoglobulinelor cu formarea unor baze Schiff în care restul de aldehidă glutarică îndeplineşte rolul unei punți de legătură între cele două componente:

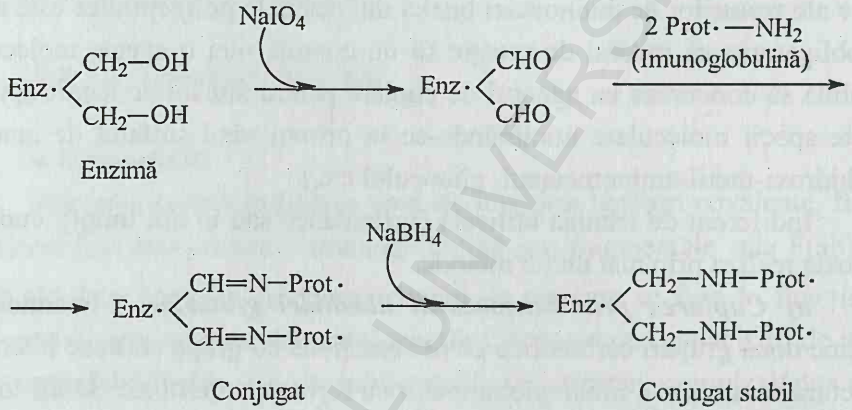
$$\underset{\text{Enzimă}}{\text{Enz.}-NH_2} + \underset{\text{Glutaraldehidă}}{HOC-(CH_2)_3-CHO} \longrightarrow$$

$$\xrightarrow[pH=6,8]{} \underset{\text{Bază Schiff}}{\text{Enz.}-N=CH-(CH_2)_3-CHO} \longrightarrow$$

$$\xrightarrow[\substack{\text{(Imunoglobulină)}\\ pH=9,5}]{\text{Prot.}-NH_2} \underset{\text{Conjugat}}{\text{Enz.}-N=CH-(CH_2)_3-CH=N-\text{Prot.}}$$

Produsul obținut prezintă o stabilitate relativ scăzută deoarece legăturile formate de aldehida glutarică nu rezistă la unele reacții complementare. Cu toate acestea, metoda cuplării cu glutaraldehidă este destul de eficientă în unele cazuri concrete.

b) Cuplarea cu ajutorul periodatului. Periodatul de sodiu oxidează grupările alcoolice primare ale resturilor glucidice din glicoproteine în grupe aldehidice active. Acestea reacționează la rândul lor cu grupele aminice libere ale proteinelor cu formare de baze Schiff ce pot fi stabilizate prin reducere cu borohidrură de sodiu:

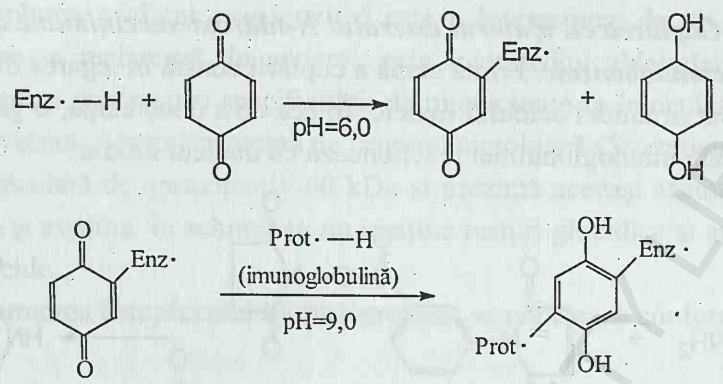


Această metodă se aplică deseori pentru enzimele bicomponente (cu structură heteroproteică). De exemplu peroxidaza, care este o glicoproteină cu un conținut în glucide de 18 %, poate fi ușor cuplată cu imunoglobulinele cu ajutorul periodatului.

Înaintea oxidării cu periodat, este necesară blocarea grupărilor -NH_2 libere din structura enzimei cu ajutorul fluorodinitrobenzenului. În aceste condiții, conjugatul obținut cu un randament foarte mare, conservă bine proprietățile enzimatice și imunologice.

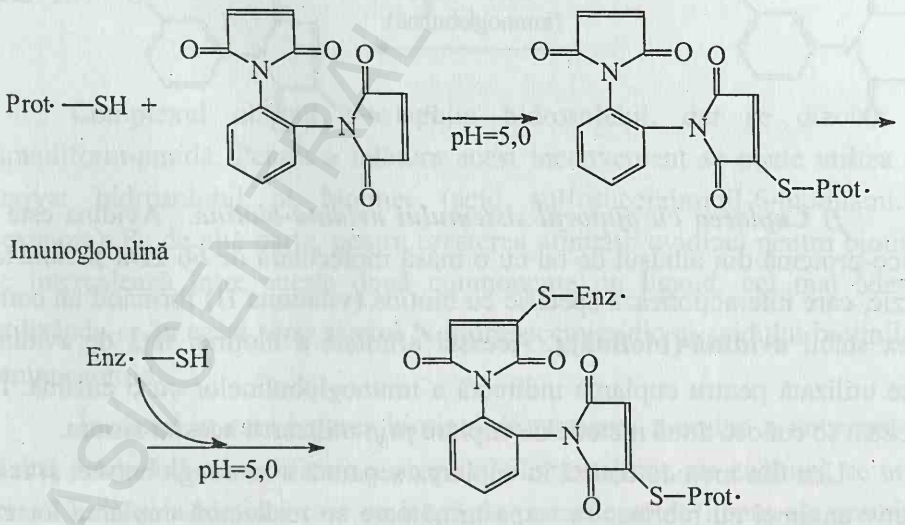
c) Cuplarea cu ajutorul benzochinonei. Această metodă se realizează în două etape în care se activează, fie enzima, fie imunoglobulinele, cu un exces de benzochinonă. În reacție sunt implicate, în principal, grupele -NH_2 și -SH ale proteinelor:

BCU CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY



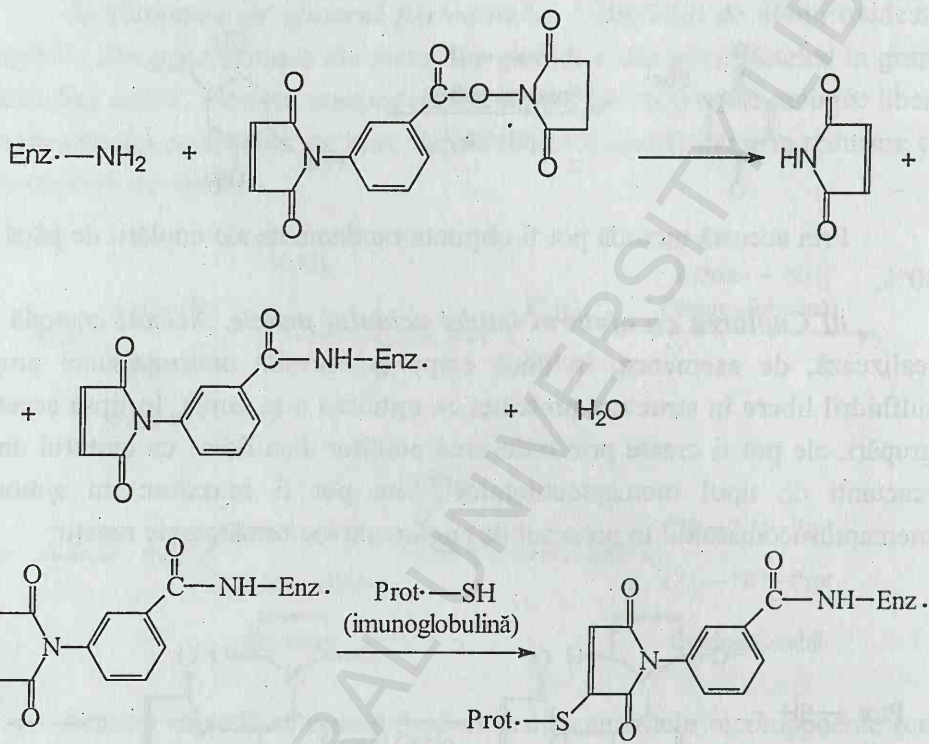
Prin această metodă pot fi obținute randamente ale cuplării de până la 80%.

d) Cuplarea cu ajutorul imidei acidului maleic. Această metodă se realizează, de asemenea, în două etape şi necesită prezența unei grupe sulfhidril libere în structura proteinei ce urmează a se cupla. În lipsa acestor grupări, ele pot fi create prin reducerea punților disulfidice cu ajutorul unor reactanți de tipul mercaptoetilaminei, sau pot fi introduse cu ajutorul mercaptosuccinatului. În procesul de cuplare au loc următoarele reacții:



Această metodă dă randamente superioare în cazul cuplării galactozidazei, care conține grupări sulfhidril libere, cu fragmente F(ab) ale imunoglobulinelor.

e) Cuplarea cu ajutorul esterului N-hidroxi-succinimidic al acidului meta-maleimidobenzoic. Prima etapă a cuplării constă în legarea de enzimă a unui derivat al imidei acidului maleic. În cea de a doua etapă, o grupare -SH din molecula imunoglobulinei reacționează cu nucleul imidic:



f) Cuplarea cu ajutorul sistemului avidină-biotină. Avidina este o glico-proteină din albușul de ou cu o masă moleculară de 66 kDa și caracter bazic, care interacționează specific cu biotina (vitamina H) formând un complex stabil **avidină-(biotină)4**. Această afinitate a biotinei față de avidină este utilizată pentru cuplarea indirectă a imunoglobulinelor cu o enzimă. În prezent se cunosc două metode de cuplare prin utilizarea acestui sistem.

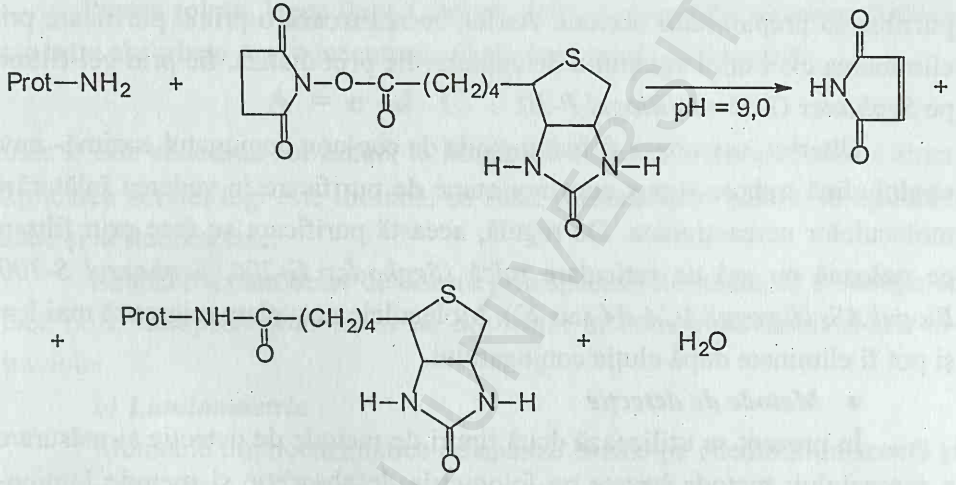
Una din metode constă în cuplarea separată a imunoglobulinei și respectiv enzimei cu biotina. În etapa următoare se realizează cuplarea lor cu avidina, ținând cont de faptul că această proteină poate lega patru molecule de vitamină H.

A doua metodă constă în cuplarea imunogloblinei cu biotina după care, conjugatul obținut se pune în contact direct cu un complex avidină-enzimă cu care se leagă spontan.

BCU IAȘI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Cuplarea avidinei cu o enzimă este o interacțiune de tip proteină - proteină ce se realizează, în general, prin intermediul aldehidei glutarice. Uneori, pentru diminuarea specificității de interacțiune se înlocuieşte avidina cu streptavidina. Această proteină de origine microbiană (*Streptomyces)* are o masă moleculară de aproximativ 60 kDa şi prezintă aceeaşi afinitate față de biotină ca şi avidina. În schimb ea nu conține resturi glucidice şi are proprietăți slab acide.

Formarea complexului biotină-proteină se realizează conform reacției:



Complexul obținut este puțin hidrosolubil, dar se dizolvă în dimetilform-amidă. Pentru a înlătura acest inconvenient se poate utiliza un derivat hidrosolubil al biotinei (acid sulfosuccinimidil-6-biotinamido-hexanoic). Pe de altă parte, pentru creşterea afinității avidinei pentru biotină, se intercalează între aceste două componente un ligand, cel mai adesea utilizându-se în acest scop esterul N-hidrosuccinimidic al acidului biotinil-ε-aminocaproic.

În cazul în care legarea biotinei de gruparea ε-amino a unui rest de lizină determină o modificare a proprietăților catalitice ale enzimei, se utilizează hidrazida biotinei care se leagă de resturile acide libere ale proteinei prin intermediul carbodiimidei, sau de resturile glucidice ale acesteia după oxidarea lor cu periodat.

Avantajul utilizării sistemului avidin-biotină în analiza imunoenzimatică constă în faptul că acest sistem permite o amplificare destul

de puternică a semnalului datorită capacității moleculei de imunoglobulină de a lega mai multe molecule enzimatice. Mai trebuie menționat faptul că legarea biotinei de un anticorp modifică punctul izoelectric al acestuia din urmă, modificându-i concomitent şi solubilitatea. Pentru a evita agregarea moleculară este necesară menținerea pH-ului mediului în care se realizează dozarea la o valoarea cu două unități mai mare decât pH-ul izoelectric al proteinei.

După realizarea cuplării, indiferent de metoda utilizată, este necesară purificarea preparatului obținut. Astfel, se realizează o primă purificare prin eliminarea excesului agentului de cuplare, fie prin dializă, fie prin gel-filtrare pe *Sephadex G-25* sau *Biogel P-10.*

Ulterior, oricare ar fi fost metoda de cuplare, conjugatul enzimă- imunoglobulină trebuie supus unor noi etape de purificare în vederea înlăturării moleculelor nereacționate. De regulă, această purificare se face prin filtrare pe coloană cu gel de reticulare mică (*Sephadex G-200, Sephacryl S-300, Biogel AS, Ultrogel ACA-34* sau *22*). Moleculele necuplate migrează mai lent şi pot fi eliminate după eluția conjugatului.

- ***Metode de detecție***

În prezent se utilizează două tipuri de metode de detecție şi măsurare a semnalului: metode bazate pe fotometria de absorbție şi metode luminometrice, primele fiind cel mai des utilizate.

a) Spectrofotometria de absorbție

În cursul unei dozări imuno-enzimatice, reacția enzimatică propriu-zisă determină modificarea unui cromogen (substratul sau o specie moleculară asociată acestuia) cu formarea unui produs ce prezintă o bandă de absorbție caracteristică în domeniul vizibil sau ultraviolet. În marea majoritate a cazurilor, cantitatea de produs este proporțională cu cantitatea de enzimă (adică marker), iar absorbanța reprezintă un semnal indirect necesar trasării curbei de etalonare.

Absorbanța unei substanțe se determină experimental prin măsurători fotometrice. Un fascicul luminos paralel, monocromatic, cu intensitatea incidentă I_0 traversează substanța. Notând cu I intensitatea transmisă, absorbanța A (sau densitatea optică) a substanței respective se definește ca fiind:

$$A = \lg I_0/I$$

În domeniul vizibil şi ultraviolet, fiecare specie moleculară prezintă un spectru de absorbţie caracteristic descris de funcţia:

$$A = f(l)$$

Graficul acestei funcţii prezintă de obicei un pic relativ larg (în intervalul a câtorva zeci de nanometri). Lungimea de undă la care se înregistrează absorbţia maximă este o caracteristică a fiecărei specii moleculare, aceasta fiind lungimea de undă la care se măsoară absorbanţa în metodele spectrofotometrice de dozare.

Pentru soluţii, legea Beer-Lambert defineşte o relaţie de proporţionalitate între absorbaţa A şi concentraţia C ale unei specii moleculare:

$$\mathbf{A = e \cdot d \cdot C}$$

unde e este absorbţia substanţei la lungimea de undă la care se face citirea. Aplicarea acestei legi este limitată, ea fiind valabilă doar pentru soluţiile diluate şi nefluorescente.

Realizarea metodelor de dozare prin spectrofotometrie de absorbţie se face utilizînd *spectrofotometrul de absorbţie* în domeniul vizibil şi/sau ultraviolet.

b) Luminometria

Metodele imunoenzimatice de analiză bazate pe chemiluminiscenţă şi fotoluminiscenţă vor fi descrise în subcapitolul X.1.5.6.

X.1.5.6. Metode de dozare

Ca şi în cazul celorlalte metode de imunoanaliză, metodele imunoenzimatice se bazează pe evaluarea ponderii trasorului liber sau legat în timpul sau la sfîrşitul reacţiei imunologice. Aceasta se poate face prin două tipuri de metode:

a) metode prin deficit de anticorpi sau *metode prin competiţie;*

b) metode prin exces de anticorpi sau *metode imunometrice.*

Cu toate acestea, clasificarea metodelor imunoenzimatice de analiză se face în funcţie de proprietăţile markerilor deoarece activitatea unui marker enzimatic poate fi diferită dacă trasorul este sau nu legat într-un complex antigen - anticorp.

Această modificare a activităţii trasorului (creştere sau diminuare după caz) stă la baza metodelor ***în fază omogenă*** care permit determinarea directă a trasorului liber sau legat, omiţând etapa de separare.

Metodele care necesită o etapă de separare a complecşilor se numesc metode ***în fază heterogenă.***

a) Metode în fază omogenă

Acestea reprezintă majoritatea metodelor prin competiţie şi se aplică în special în cazul haptenelor. Metodele în fază omogenă se bazează pe principiul **EMIT (*Enzyme Multiplied ImmunoAssay Test)*** utilizat foarte des la dozarea medicamentelor şi a hormonilor cu masă moleculară mică (tiroxină, cortizol etc.) (fig. 166). În cazul acestor metode, legătura dintre conjugat şi anticorp maschează centrul activ al enzimei care, în felul acesta, nu poate ataca substratul. Cantitatea de enzimă activă, deci implicit semnalul măsurat, creşte o dată cu creşterea concentraţiei antigenului dozat.

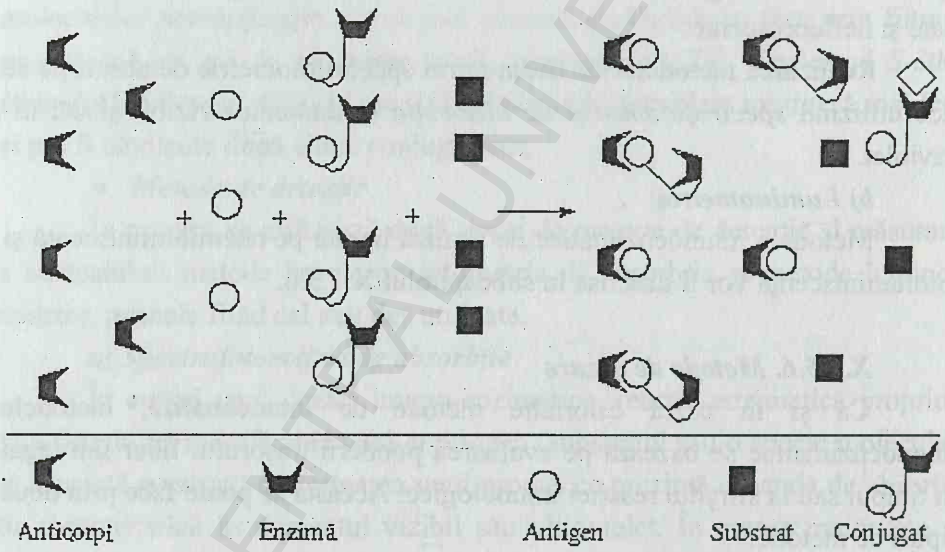


Fig. 166. Reprezentarea schematică a principiului metodei EMIT în fază omogenă (Barbier, Y. - 1989)

b) Metode în fază heterogenă

Dintre metodele în fază heterogenă, cel mai adesea se utilizează metodele **ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay).***

BCU IASI CENTRALA UNIVERSITARA LIBRARY

La rândul lor, metodele ELISA se împart în două grupe principale: *metode prin competiție* ***(ELISA competition)*** *şi metode imunometrice* ***(ELISA sandwich)*** (fig. 167 şi 168).

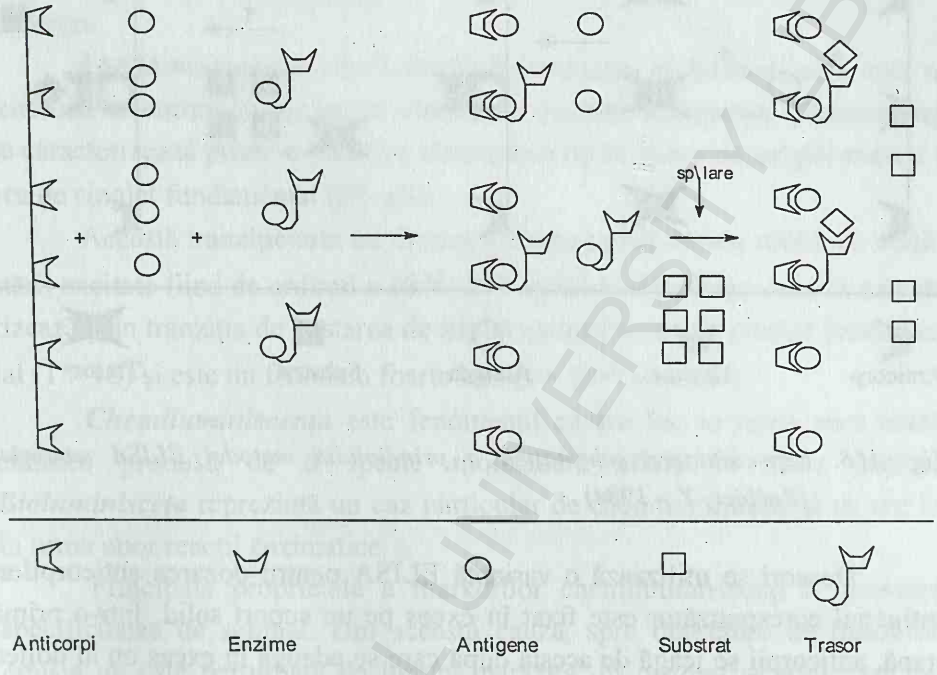


Fig. 167. Reprezentarea schematică a principiului metodei ELISA competition în fază solidă (Barbier, Y. - 1984)

BCU IAŞI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

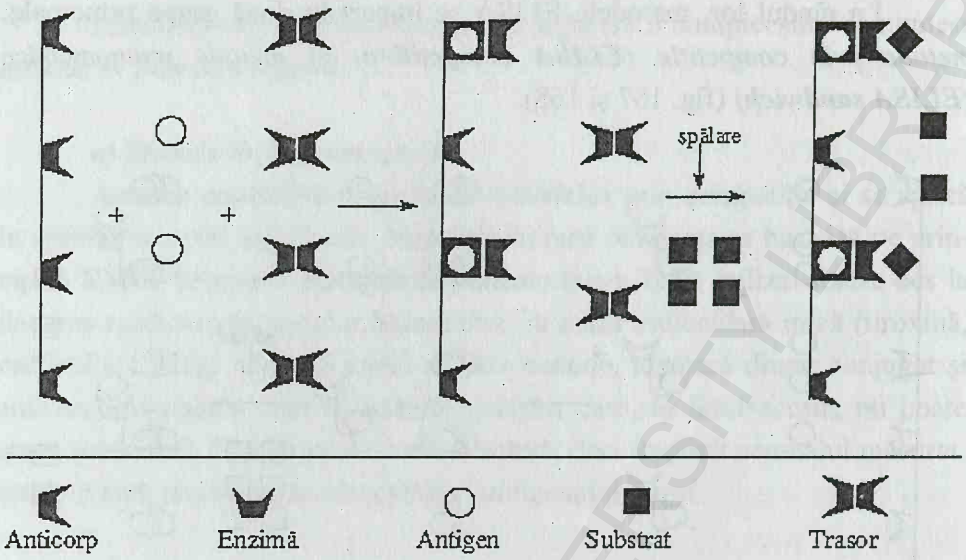


Fig. 168. Reprezentarea schematică a principiului metodei ELISA sandwich (Barbier, Y. - 1984)

Deseori se utilizează o variantă ELISA pentru dozarea anticorpilor: antigenul corespunzător este fixat în exces pe un suport solid. Într-o primă etapă, anticorpii se leagă de acesta după care se adaugă în exces un al doilea anticorp marcat, specific imunoglobulinelor umane.

•Metode imunoenzimatice de analiză cu markeri fotoluminiscenți şi chemiluminiscenți.

În ultimul deceniu s-a recurs la o alternativă a utilizării markerilor radioactivi care constă în cuplarea de luminofori cu anticorpi sau antigene specifice. Prin ***luminofor*** se înțelege orice moleculă sau orice grupă funcțională capabilă să emită lumină sub acțiunea unei excitații.

Este cunoscut faptul că energia unei molecule reprezintă suma a trei energii componente: energia E_r care determină momentul de rotație a moleculei în jurul centrului său de greutate, energia E_v care determină vibrațiile atomilor moleculei respective unii în raport cu alții şi energia electronică E_e care depinde de repartiția electronilor.

O moleculă care absoarbe suficientă energie pentru a trece la un nivel de energie (electronică E_e, de vibrație E_v sau de rotație E_r) superior (nivel excitat), revine spontan la nivelul fundamental de energie. Această revenire se poate face cu emisia unui foton, fenomenul respectiv stând la baza luminiscenței.

Fotoluminiscența, care include fluorescența și fosforescența, este un fenomen de emisie ce are loc în urma unei excitații luminoase. ***Fluorescența*** se caracterizează printr-o tranziție electronică de la starea de singlet excitat la cea de singlet fundamental ($S^* \rightarrow S$).

Această tranziție este un fenomen foarte rapid, durata medie de viață a stării excitate fiind de ordinul a 10^{-9}-10^{-8} secunde. ***Fosforescența*** se caracterizează prin tranziția de la starea de triplet excitat la cea de singlet fundamental ($T^* \rightarrow S$) și este un fenomen foarte lent ($t = 10^{-8}$ secunde).

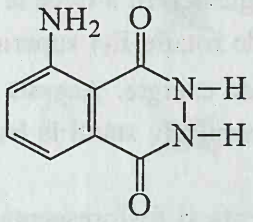
Chemiluminiscența este fenomenul ce are loc în urma unei reacții chimice produsă de o specie moleculară aflată în stare excitată. ***Bioluminiscența*** reprezintă un caz particular de chemiluminiscență ce are loc în urma unor reacții enzimatice.

Principala proprietate a markerilor chemiluminiscenți o constituie specificitatea de semnal. Din această cauză, spre deosebire de fluorofori, emisia nu este perturbată de lumina parazită. În prezent se utilizează mai mulți markeri chemiluminiscenți consacrați.

a) Derivați de ftalilhidrazidă

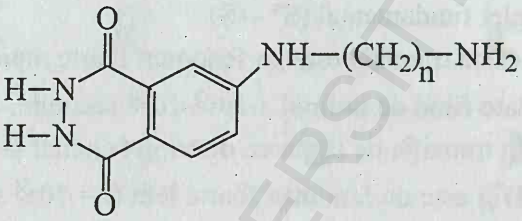
Din această clasă, cel mai adesea se utilizează luminolul, izoluminolul și o serie de derivați ai izoluminolului:

BCU IASI/CENTRUL UNIVERSITAR LIBRARY



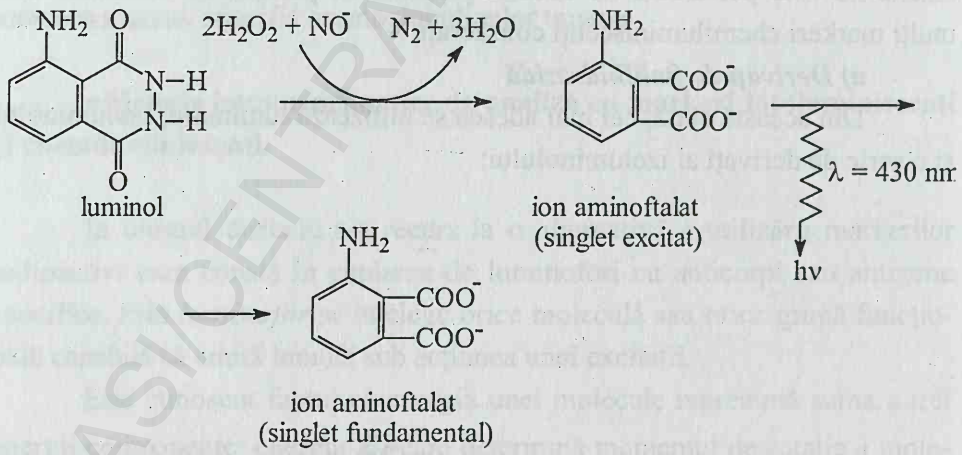
luminol

izoluminol



derivați ai izoluminolului

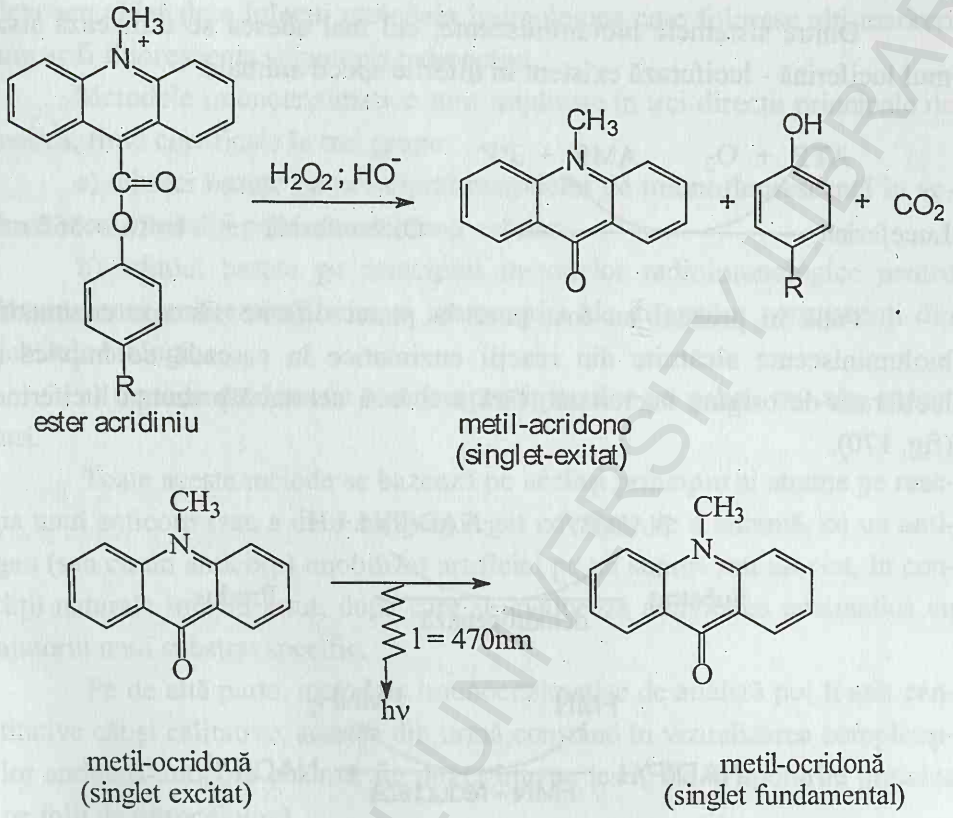
În urma reacțiilor de oxidare în prezența apei oxigenate şi a peroxidazei, aceşti compuşi se transformă în specii moleculare excitate care revin la starea fundamentală cu emisie de fotoni:



b) Esterii de acridiniu

Spre deosebire de markerii anteriori, aceştia nu necesită prezența obligatorie a unui agent catalitic (peroxidază sau unii ioni metalici):

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY



c) Markeri enzimatici

Deşi nu sunt molecule chemiluminiscente, enzimele sunt folosite adesea în calitate de marker pentru antigene sau anticorpi şi pot fi detectate datorită reacţiilor chemiluminiscente pe care le catalizează. Un exemplu concret în acest sens îl reprezintă utilizarea peroxidazei (fig. 169).

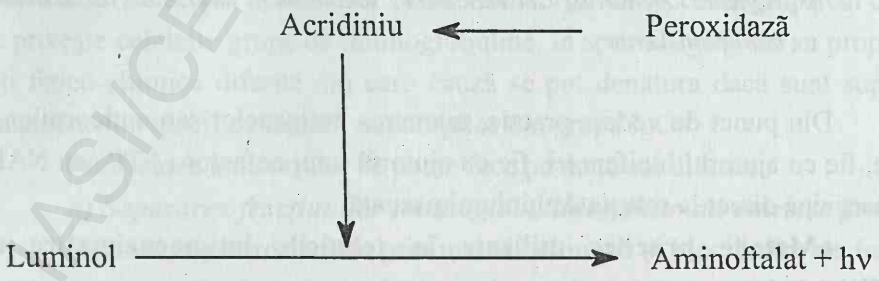
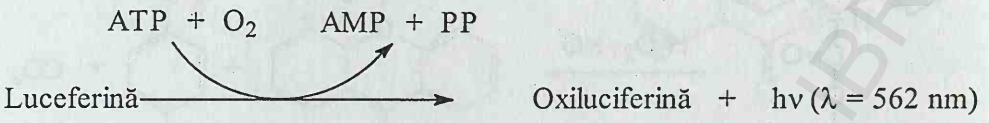


Fig. 169. Exemplu de marker chemiluminiscent enzimatic (Rador, B., Dechaud, H. - 1989)

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Dintre sistemele bioluminiscente, cel mai adesea se utilizează sistemul luciferină - luciferază existent în diferite specii animale:



Până în prezent au fost puse la punct diferite sisteme enzimatice bioluminiscente alcătuite din reacții enzimatice în cascadă ce implică și luciferaza de origine bacteriană, fără a fi însă necesară prezența luciferinei (fig. 170).

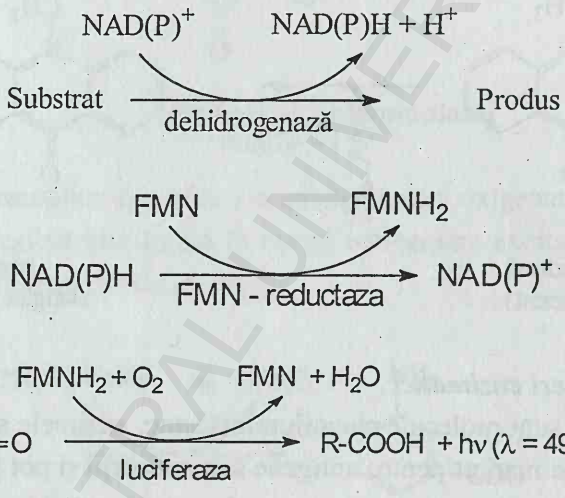


Fig. 170. Schema generală a reacțiilor enzimatice utilizate în sistemele bioluminiscente

Din punct de vedere practic, marcarea antigenelor sau anticorpilor se face, fie cu ajutorul luciferazei, fie cu ajutorul unui cofactor (ATP sau NAD) ce participă direct la reacția de bioluminiscență.

•Metode practice utilizate în tehnicile imunoenzimatice de analiză

Utilizarea enzimelor în calitate de marker pentru anticorpi sau antigene stă la baza a numeroase metode imunoenzimatice care au rolul de a com-

pleta sau chiar de a înlocui metodele imunologice care folosesc alți markeri cum ar fi fluorescența și izotopii radioactivi.

Metodele imunoenzimatice sunt implicate în trei direcții principale de analiză, fiind clasificate în trei grupe:

a) tehnici bazate pe principiul metodelor de imunofluorescență în vederea localizării diferiților constituenți celulari;

b) tehnici bazate pe principiul metodelor radioimunologice pentru dozarea unor concentrații mici și foarte mici ale diferiților constituenți din lichidele biologice;

c) metode de detecție a imunoprecipitatelor pe geluri sau alte suporturi.

Toate aceste metode se bazează pe același principiu și anume pe reacția unui anticorp (sau a unui antigen) legat covalent de o enzimă, cu un antigen (sau cu un anticorp) imobilizat artificial pe un suport sau asociat, în condiții naturale într-un țesut, după care se evaluează activitatea enzimatică cu ajutorul unui substrat specific.

Pe de altă parte, metodele imunoenzimatice de analiză pot fi atât cantitative cât și calitative, acestea din urmă constând în vizualizarea complecșilor antigenă-anticorp-enzimă, fie direct într-un țesut, fie în spoturile proteice pe folii de nitroceluloză.

Metodele imunoenzimatice de analiză utilizează anticorpi marcați enzimatic. Pentru prepararea lor se folosesc anticorpi purificați din serurile sanguine provenite de la animale hiperimune, anticorpi din supernatantele culturilor celulare sau anticorpi monoclonali.

Anticorpii utilizați în acest scop aparțin exclusiv grupei IgG, iar metodele descrise se pot aplica doar pentru anticorpii din această grupă. În ceea ce privește celelalte grupe de imunoglobuline, în special IgM, ele au proprietăți fizico-chimice diferite din care cauză se pot denatura dacă sunt supuse tratamentelor specifice izolării anticorpilor din grupa IgG.

Purificarea anticorpilor se poate face pe două căi diferite:

a) Separarea fracțiunilor imunoglobulinice dintr-un amestec proteic

Această separare se face prin metode chimice și biochimice de fracționare, comune cu cele utilizate în studiul proteinelor în general. Prin aceste metode se separă deci fracțiunea ce conține imunoglobulinele G cu aceleași proprietăți fizico-chimice dar cu funcții imunologice diferite.

b) Separarea anticorpilor specifici față de un anumit antigen

Acest tip de separare se realizează prin procedee imunochimice bazate pe utilizarea unui antigen insolubilizat (imunoadsorbant) care leagă specific anticorpii prezenți într-un mediu, de exemplu în serul sanguin. Complexul anticorp-antigen se separă apoi din faza lichidă după care anticorpii se izolează prin disocierea lor din complecşi prin tratament acid sau cu ajutorul agenților denaturanți. Prin această tehnică se obține o populație de anticorpi puri deoarece antigenul utilizat dirijează specific numai anumiți anticorpi.

Utilizarea anticorpilor puri este absolut necesară din următoarele raționamente:

- prezența unor imunoglobuline cu funcții imunologice diferite poate determina reacții fals pozitive;
- deoarece aceşti anticorpi urmează a fi cuplați cu o enzimă, se evită utilizarea altor enzime sau legarea unor cantități suplimentare din enzima respectivă care determină obținerea unor complecşi inutili;
- în cazul în care concentrația unor imunoglobuline marcate enzimatic este mare se obține un semnal de fond crescut, care diminuează exactitatea determinării.

• **Metode imunoenzimatice de analiză cantitativă**

Metodele imunoenzimatice de analiză permit dozarea cu un grad foarte înalt de sensibilitate a diferiților constituenți de interes biochimic. Metodele folosite astăzi se bazează pe două principii: a) un procedeu în care este necesară o fază solidă pentru imobilizarea antigenului sau anticorpului asociat cu o enzimă şi evaluarea activității enzimei din complexul *antigenă - anticorp - enzimă,* adică dozări în *fază heterogenă* şi b) un procedeu în care dozarea complexului *antigenă - anticorp - enzimă* se face direct în mediul de incubare, adică dozări în *fază omogenă.*

Metodele de dozare imunoenzimatică în fază heterogenă au fost descrise inițial pentru dozarea antigenelor şi apoi extinse la dozarea anticorpilor, metodele ELISA fiind astăzi utilizate în mod curent în toate tehnicile ce utilizează enzime marker.

• ***Descrierea generală a metodelor imunoenzimatice cantitative***

Dozarea antigenelor se poate realiza fie printr-un procedeu de tip competitiv, fie necompetitiv.

a) Procedeul non-competitiv sau de tip sandwich. Într-o primă fază, antigenul ce urmează a se doza interacționează cu anticorpii specifici fixați pe

un suport. Cantitatea de antigene legate se evaluează în a doua etapă, după reacția lor cu anticorpi de aceeași specificitate, cuplați cu o enzimă (fig. 171). Pentru dozare este obligatoriu ca antigenul să posede mai mulți epitropi identici sau nu, în așa fel încât după reacția cu anticorpii imobilizați să fie capabili să reacționeze cu un al doilea anticorp specific, acesta din urmă fiind cuplat cu o enzimă.

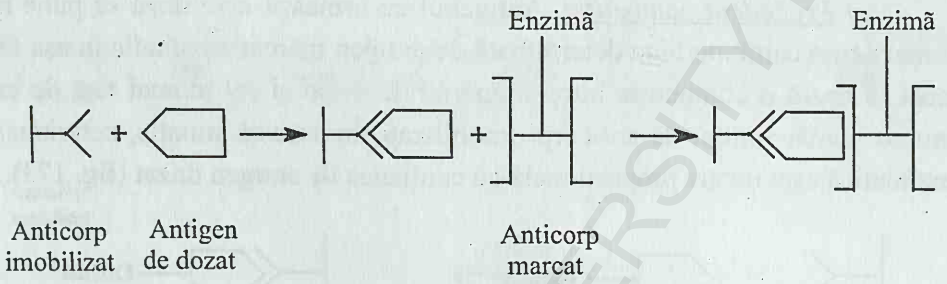


Fig. 171. Reprezentarea schematică a tehnicii de dozare a anticorpilor prin metoda non-competitivă (sandwich)

Din această cauză, activitatea enzimatică dozată este proporțională cu cantitatea de antigen fixată de primul anticorp.

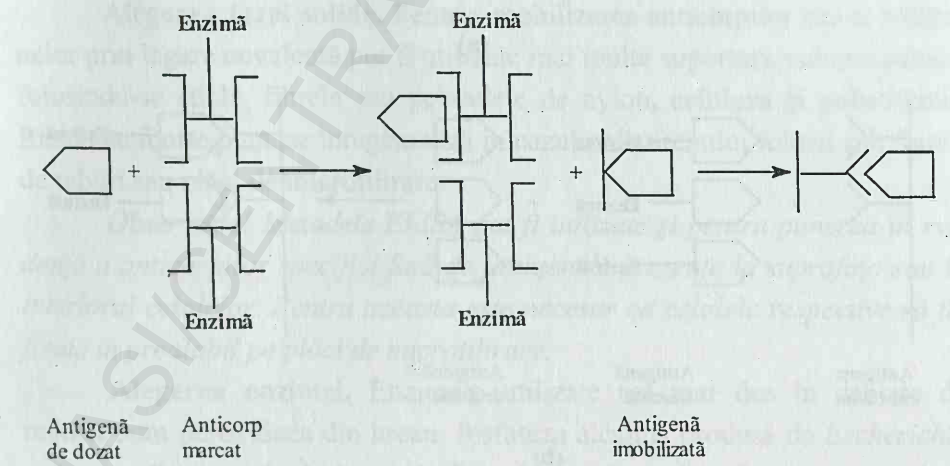


Fig. 172. Reprezentarea schematică a tehnicii de dozare a anticorpilor prin metoda enzimo-imunometrică

B.C.U. „M. EMINESCU" IAȘI
BIOLOGIE

*b) **Procedeul non-competitiv enzimo-imunometric.*** Acest procedeu se bazează pe incubarea antigenului ce urmează a fi dozat cu anticorpii marcați, specifici acestuia. Excesul de anticorpi marcați, nelegați de antigene, se evaluează în funcție de interacțiunea lor cu antigenele specifice imobilizate pe un suport insolubil. Activitatea enzimatică este invers proporțională cu concentrația antigenelor (fig. 172).

c) Procedeul competitiv. Antigenul ce urmează a se doza se pune în contact cu o cantitate bine determinată de antigen marcat enzimatic în așa fel încât să apară o competiție între antigenul de dozat și cel marcat față de un anumit număr limitat de anticorpi imobilizați. În această situație, activitatea enzimatică este invers proporțională cu cantitatea de antigen dozat (fig. 173).

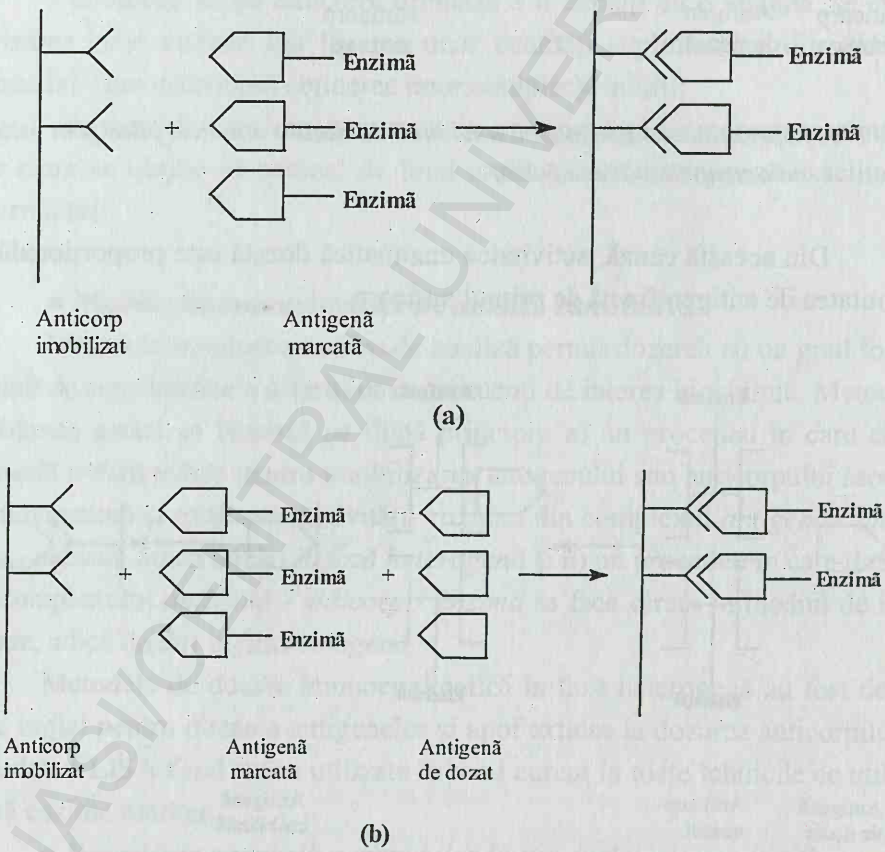


Fig. 173. Dozarea antigenelor prin procedeul competitiv: a) - în absența antigenului, b) - în prezența antigenului

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

d) Fixarea anticorpilor prin procedeul competitiv. Într-o primă etapă, anticorpii ce urmează a se doza reacționează cu antigenele specifice imobilizate, iar în etapa a doua, cantitatea de anticorpi fixați de antigene se dozează cu ajutorul altor anticorpi (anti-imunoglobuline) marcați enzimatic (fig. 174). În această situație, activitatea enzimatică este direct proporțională cu cantitatea de anticorpi dozați.

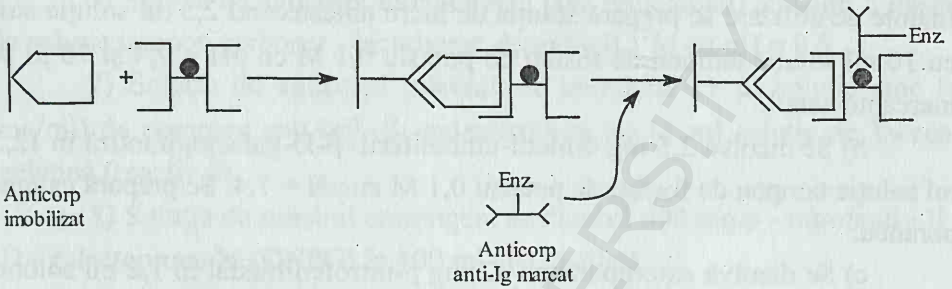


Fig. 174. Reprezentarea schematică a tehnicii de dozare a anticorpilor prin procedeul competitiv

Pentru realizarea practică a acestei metode trebuie luate în considerare anumite aspecte legate de alegerea fazei solide, a enzimei marker, a substratului etc.

Alegerea fazei solide. Pentru imobilizarea anticorpilor sau a antigenelor prin legare covalentă pot fi utilizate mai multe suporturi, cel mai adesea folosindu-se sticla, fibrele sau peliculele de nylon, celuloza și polistirenul. Rezultate foarte bune se înregistrează în cazul polistirenului folosit sub formă de tuburi sau plăci de microfiltrare.

Observație! Metodele ELISA pot fi utilizate și pentru punerea în evidență a anticorpilor specifici față de antigenele prezente la suprafața sau în interiorul celulelor. Pentru aceasta este necesar ca celulele respective să fie fixate în prealabil pe plăci de microfiltrare.

Alegerea enzimei. Enzimele utilizate cel mai des în calitate de marker sunt peroxidaza din hrean, fosfataza alcalină produsă de *Escherichia coli* sau din intestinul de vițel, β –galactozidaza din *Escherichia coli* și glucozoxidaza din *Aspergillus niger.*

Alegerea substratelor. Unele substrate specifice utilizate la determinarea activității enzimatice au proprietatea de a forma produși colorați ce

oferă posibilitatea măsurării exacte a densității optice în domeniul vizibil. În unele situații, substratele sau produşii de reacție sunt cromogeni, iar în altele se utilizează cromogeni asociați (vezi cap. V.2.).

Prepararea soluțiilor principalelor substrate se face astfel:

a) Se dizolvă 400 mg o-nitrofenil- β-D-galactopiranoză în 100 ml apă distilată. Această soluție stoc se poate păstra la + 4° C timp de câteva luni. Înainte de utilizare se prepară soluția de lucru amestecând 2,5 ml soluție stoc cu 10 ml soluție tampon de fosfați de potasiu 0,1 M cu pH = 7,4 şi 70 µl β-mercaptoetanol.

b) Se dizolvă 2,5 mg 4-metil-umbeliferil- β-D-galactopiranoză în 12,5 ml soluție tampon de fosfați de potasiu 0,1 M cu pH = 7,4. Se prepară extemporaneu.

c) Se dizolvă extemporaneu 12 mg p-nitrofenilfosfat în 1,2 ml soluție tampon Tris-NaOH 1 M cu pH = 9,8 (în cazul fosfatazei alcaline din intestinul de vițel) respectiv 8,2 (pentru enzima din *E .coli*) după care se adaugă 0,8 ml NaCl 1,5 M.

d) Se dizolvă extemporaneu 6 mg o-fenilendiamină în 12 ml soluție tampon acid citric - citrat de sodiu 0,1 M cu pH = 5,5 şi se adaugă 100 µl H_2O_2 3 % imediat înaintea utilizării.

e) Se dizolvă 5 mg tetrametil-benzidină într-un ml de DMSO (dimetil-sulfoxid). Se adaugă apoi 0,25 ml din această soluție la 12 ml soluție tampon citrat 0,1 M cu pH = 5,5. Se agită şi se adaugă 100 µl H_2O_2 3 %.

f) Se dizolvă 120 mg D-glucoză în 10 ml soluție tampon Tris-HCl 0,1N cu pH = 7,2. După 30 de minute se adaugă 1 mg peroxidază şi 6 mg de o-fenilendianmină.

• ***Dozarea IgE umane cu ajutorul conjugatului anti-IgE marcat cu β-galactozidază***

Reactivi. 1) Soluție tampon de fosfați de potasiu 0,01 M cu pH = 7,4 în soluție de NaCl 0,15 M.

2) Soluție de gelatină 5 %: se suspendă 25 grame de gelatină în 500 ml de apă distilată şi se fierbe până la dizolvare completă. Se repartizează apoi soluția obținută în flacoane de 25 ml şi se stochează la frigider (+4°C). Înainte de utilizare se încălzeşte pe baia de apă pentru redizolvarea gelului.

3) Soluție de gelatină 0,5 %: se amestecă 1 ml soluție stoc de gelatină 5 % cu 9 ml soluție tampon fosfat (1).

4) Soluție de Tween în tampon fosfat: se adaugă 1 ml Tween 20 la 1000 ml soluție tampon (1).

5) Soluție Tween-gelatină: se adaugă 1 ml soluție de gelatină 5 % la 9 ml soluție Tween (4) şi se agită pentru omogenizare.

6) Soluție de anticorpi monoclonali (sau policlonali) anti-IgE 5 μg/ml în soluție tampon carbonat - bicarbonat de sodiu 0,1 M cu pH = 9,5.

7) Soluție de anticorpi marcați: se amestecă 11 μl soluție stoc (1 mg/ml) de complex anti-IgE- β -galactozidază cu 11 ml soluție de Tween-gelatină (reactiv 5).

8) Soluție de substrat cromogen: se dizolvă 400 mg o - nitrofenil - β - D - galactopiranoză (ONPG) în 100 ml apă distilată.

9) Soluție de substrat fluorogen: se dizolvă 2,5 mg de 4 - metil - umbeliferil - β - D - galactopiranoză (MLG) în 12,5 ml soluție tampon de fosfați de potasiu 0,1 M cu pH = 7,4. Se prepară extemporaneu.

10) Soluție de carbonat de sodiu 2 M.

Modul de lucru. Se activează plăcile de imunoadsorbant cu 100 l soluție de anticorpi anti-IgE timp de 2 ore la 37°C şi apoi 10 - 12 ore la +4°C după care se spală cu reactiv (4), se videază şi se saturează cu 100 ml soluție de gelatină 0,5 % (reactiv 3).

În paralel se prepară 1 ml soluție etalon de IgE cu 300 U.I. / ml în soluție de Tween - gelatină (reactiv 5). Cu ajutorul unei micropipete multicanal reglabilă de 100 μl şi echipată cu 12 vârfuri, se adaugă câte 50 μl de soluție standard de IgE 600 μg / ml (300 U.I. / ml) în godeurile A, B, E şi F ale rețelei şi respectiv câte 50 μl de ser sanguin diluat cu reactiv (5) în raport volumetric de 1:50 în godeurile C, D, G şi H (fig. 175).

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

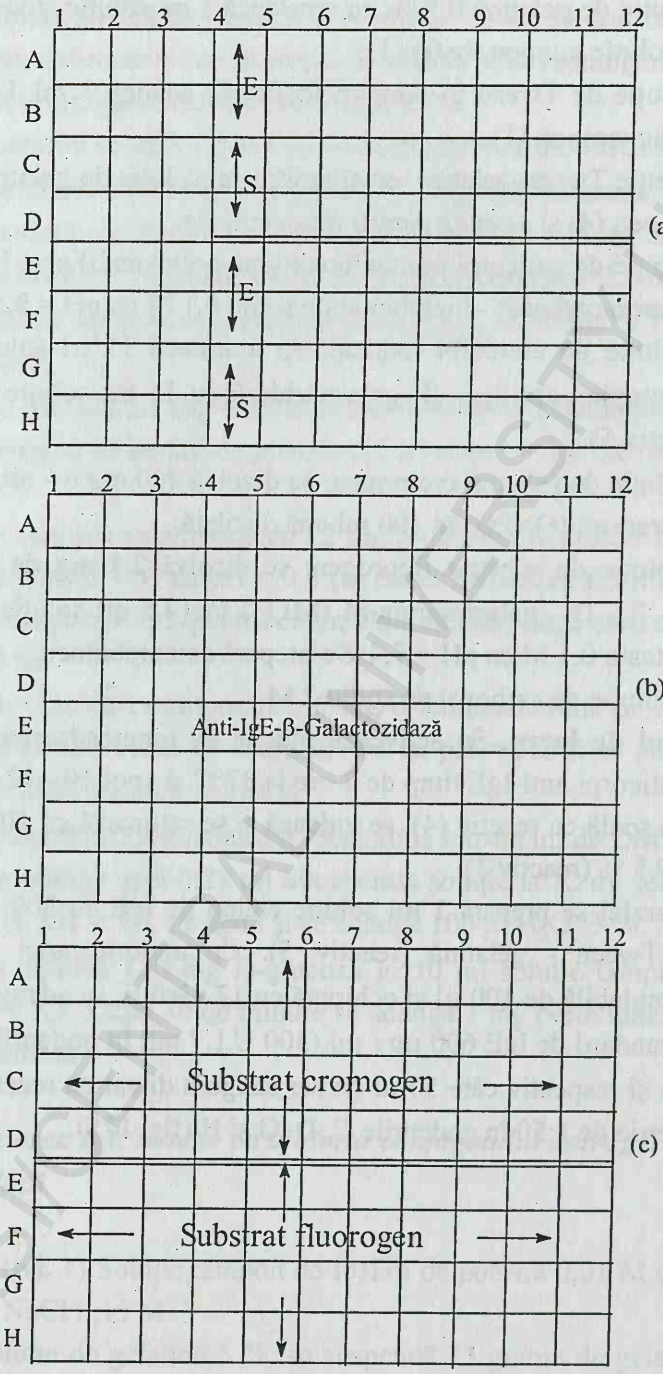


Fig. 175. Reprezentarea schematică a rețelei plăcilor de imunoadsorbant

BCU IAȘI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Cu ajutorul unei micropipete multicanal reglabilă de 50 µl şi echipată cu 8 vârfuri se amestecă mediile din rândul 4 (de la A la H) şi se transferă câte 50 µl în rândul 5, după care se repetă operaţiunea transferând câte 50 µl din mediile obţinute în rândul 5 în godeurile corespunzătoare din rândul 6 ş.a.m.d. până la rândul 12 din care se vor arunca câte 50 µl.

Se incubează placa timp de 60 minute la 37°C şi apoi 12 ore la +4° C după care se spală cu reactivul (4). Se adaugă apoi 100 l conjugat anti-IgE uman - β-galactozidază (1 µg / ml) în modul arătat în figura 174 b, se incubează 60 minute la 37°C şi se spală ca mai sus.

În ultima etapă se adaugă soluţiile de substrat (reactivii 8 şi respectiv 9) aşa cum se arată în figura 174 c. După 2 ore se citeşte densitatea optică la 414 nm, respectiv fluorescenţa şi se trasează curba standard pe hîrtie logaritmică, în modul arătat în figura 176.

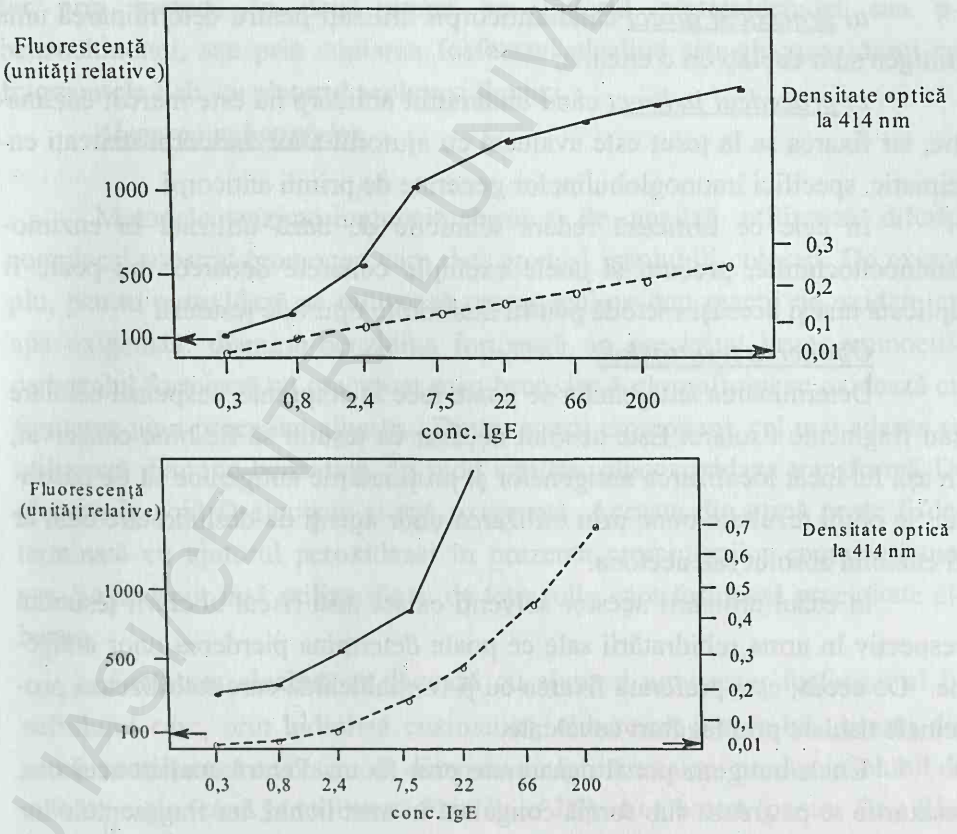


Fig. 176. Trasarea curbei standard pentru dozarea IgE cu ajutorul conjugatului anti-IgE marcat cu β-galactozidază

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

X.1.5.7. Noțiuni generale asupra metodelor enzimo-imunocitochimice de analiză.

Principiul general. Aceste tehnici utilizează anticorpi marcați enzimatic pentru localizarea diferiților constituienți ai celulelor și țesuturilor, respectiv pentru evaluarea anticorpilor unor anti-constituienți celulari prezenți în serul sanguin în unele afecțiuni patologice.

Principiile de bază ale acestor metode sunt aceleași ca în cazul metodelor de imunofluorescență, cu excepția faptului că evaluarea coloratiei citochimice specifice enzimei marker este înlocuită prin măsurarea fluorescenței. Metodele enzimo-imunocitochimice se pot realiza prin două procedee diferite:

a) procedeul direct când anticorpii utilizați pentru determinarea unui antigen sunt cuplați cu o enzimă;

b) procedeul indirect când un anumit anticorp nu este marcat enzimatic, iar fixarea sa la țesut este avaluată cu ajutorul altor anticorpi marcați enzimatic, specifici imunoglobulinelor generate de primii anticorpi.

În cele ce urmează redăm tehnicile de bază utilizate în enzimo-imunocitochimie, precum și unele exemple concrete deoarece nu poate fi aplicată una și aceeași metodă pentru mai multe tipuri de țesuturi.

Obținerea țesuturilor.

Determinarea antigenelor se poate face în amprente, suspensii celulare sau fragmente tisulare. Este absolut necesar ca țesutul să fie bine conservat, în așa fel încât localizarea antigenelor și proprietățile antigenice să fie păstrate. Se obțin rezultate bune prin utilizarea unor agenți de deshidratare cum ar fi etanolul absolut sau acetona.

În cazul utilizării acestor solvenți există însă riscul alterării țesutului respectiv în urma rehidratării sale ce poate determina pierderea unor antigene. De aceea, este preferată fixarea cu p-formaldehidă care stabilizează proteinele tisulare prin legături covalente.

Unele antigene pot fi denaturate prin fixare. Pentru analiza acestora, țesuturile se păstrează sub formă congelată în azot lichid, iar fragmentele lor sunt decongelate și tratate în continuare fără a mai fi fixate.

Alegerea enzimelor.

Metodele enzimo-imunocitochimice utilizează acele enzime pentru care există substrate specifice ce dau produşi insolubili sau coloraţi. Cel mai adesea se folosesc peroxidaza, fosfataza alcalină şi glucozoxidaza.

β-Galactozidaza nu este utilizată în aceste metode deoarece are o masă moleculară foarte mare, ceea ce determină o scădere a vitezei de migrare a conjugatului enzimatic în ţesut.

Obţinerea anticorpilor marcaţi enzimatic.

Pentru metodele enzimo-munocitochimice se folosesc complecşii anticorp-enzimă obţinuţi prin metodele descrise în cap. X.1.5.5. Cele mai bune rezultate se obţin prin cuplarea peroxidazei cu fragmentele Fab ale anticorpilor prin metoda în două etape cu ajutorul glutaraldehidei sau p-benzochinonei, sau prin cuplarea fosfatazei alcaline sau glucozoxidazei cu fragmentele Fab, cu ajutorul aceloraşi liganzi.

Alegerea substratelor

Metodele enzimo-imunocitochimice de analiză utilizează diferiţi complecşi substrat-cromogen care dau produşi insolubili coloraţi. De exemplu, pentru peroxidază se utilizează cromogeni ce dau reacţii de oxidare cu apa oxigenată: diamino-benzidina formează un precipitat brun, aminoetilcarbazolul formează un precipitat roşu-brun, iar 4-clornaftolul se oxidează cu formarea unui precipitat albastru. Dintre aceşti cromogeni, cel mai adesea se utilizează diamino-benzidina. În mod similar, glucozoxidaza transformă D-glucoza în acid D-gluconic şi apă oxigenată. Aceasta din urmă poate fi determinată cu ajutorul peroxidazei în prezenţa cromogenilor enumeraţi mai sus. Se mai pot însă utiliza săruri de tetrazoliu care formează precipitate albastre.

Fosfataza alcalină se dozează cu ajutorul unui ester fosforilat al β-naftolului care, prin hidroliză enzimatică, eliberează β-naftolul. Acesta din urmă reacţionează cu o sare de diazoniu cu formarea unui produs insolubil de culoare roşie (când se utilizează *Fast Reed TR*) sau albastră (pentru *Fast Blue BB*).

Alegerea metodei de determinare

Materiale şi reactivi

1) Reactiv Hanks;
2) Ficoll-Paque (Pharmacia);
3) p-Formaldehidă;
4) Mediu MSL (Eurobio);
5) Eter etilic;
6) Etanol absolut;
7) Acetonă;
8) N,N′-Dimetilformamidă;
9) Clorură de amoniu;
10) Clorură de cobalt;
11) Acid acetic glacial;
12) D-glucoză;
13) Amestec glicerol-gelatină pentru microscopie (Serva);
14) Levamisol (Serva);
15) Substrate:
    - tetraclorhidrat de diamino-benzidină;
    - 4-clor-1-naftol;
    - 3-aminoetil-carbazol;
    - naftol-fosfat (sare sodică);
    - Fast Red TR;
    - Fast Blue BB;
- 3-(4′,5′-dimetil-tiazolil-2-)-2,4-difeniltetrazoliu-MTT (Sigma);
- Fenazin-metosulfat.

16) Soluție tampon de fosfați de potasiu 0,01 M cu pH = 7,4 în soluție de NaCl 0,15 M.
17) Soluție tampon de fosfați de potasiu 0,1 M cu pH = 7,4.
18) Soluție tampon Tris - HCl 0,1 M cu pH = 7,2.
19) Soluție tampon acid acetic - acetat de sodiu 0,1 M cu pH = 5,0.
20) Soluție de NH_4Cl 0,87 % (se păstrează la rece).
21) Soluție de H_2O_2 3 %.

Procedura experimentală

Fixarea țesutului. După recoltarea țesutului, acesta poate fi congelat imediat, fixat şi inclus în parafină sau deshidratat prin liofilizare. Metodele

enzimo-imunocitochimice pot utiliza, de asemenea, suspensii celulare care se spală în prealabil pentru înlăturarea proteinelor solubile, după care se întind pe o lamă de microscop prin procedeul clasic de preparare a frotiurilor. Mai pot fi utilizate preparate celulare cultivate pe lamele.

Obținerea agenților de fixare

1) Soluție de p-formaldehidă 4%: se dizolvă 4 grame de p-formaldehidă în 100 ml soluție tampon fosfat 0,1 M cu pH = 7,4 încălzind la 80°C pe agitator magnetic. După dizolvare, soluția obținută se răceşte sub jetul de apă de robinet.

2) Amestec etanol-eter etilic 6/4 (v/v).

3) Amestec etanol - acid acetic glacial 3/1 (v/v).

4) Acetonă răcită la -20°C.

Fixarea țesuturilor. Fixarea țesuturilor se poate realiza prin mai multe metode.

a) Fixarea în amestecuri etanol-eter etilic sau etanol-acid acetic glacial. Se introduc lamele pentru 10 minute în amestecul de fixare la temperatura laboratorului, după care se usucă complet agitîndu-le în aer sau menținîndu-le în fața unui ventilator. Înainte de utilizare se rehidratează cu soluție tampon de fosfați de potasiu 0,01 M cu pH = 7,4 în soluție de NaCl 0,15 M.

b) Fixarea în acetonă. Cu o zi înainte de efectuarea fixării se introduce acetona în congelatorul reglat la -20°C. Pentru fixarea propriu-zisă se menține lama în acetona rece timp de 10 minute, după care uscarea şi rehidratarea se fac ca în procedeul descris la punctul (a).

c) Fixarea cu p-formaldehidă. Se menține lama timp de 20 minute într-o soluție de p-formaldehidă 4 % (reactiv 1) la temperatura laboratorului şi se spală prin treceri succesive prin trei băi cu soluție tampon de fosfați de potasiu 0,01 M cu pH = 7,4 în soluție de NaCl 0,15 M.

Marcarea imunocitochimică a țesuturilor.

Fragmantele tisulare (sau suspensia celulară când este cazul) se incubează timp de 60 minute cu soluția de anticorpi în tampon fosfat 0,01 M cu pH = 7,4 ce conține 0,15 M NaCl. Concentrația acestei soluții depinde de anticorpii utilizați (vezi observațiile finale). Pentru un antiser ce conține anticorpi monoclonali de exemplu, diluția acestora cu soluție tampon oscilează între 1:25 şi 1:250. Rezultate foarte bune se obțin atunci când soluția tampon de diluție conține albumină serică bovină de concentrație 1 mg / ml.

La sfîrşitul perioadei de incubare se spală de două ori preparatul cu soluţie tampon de fosfaţi de potasiu 0,01 M cu pH = 7,4 în soluţie de NaCl 0,15 M după care se incubează în prezenţa anticorpilor marcaţi enzimatic (20 - 40 mg / ml în acelaşi tampon) timp de 90 minute. Se spală din nou cu acelaşi tampon de 3 ori după care se incubează lama în prezenţa substratului (timpul de incubare depinde de substrat şi este redat în paragraful următor). Se spală apoi cu apă distilată şi se montează preparatul între lamă şi lamelă cu glicerol-gelatină.

Prepararea soluţiilor de substrat

Pentru fiecare enzimă marker se pot utiliza anumite substrate.

Peroxidaza. Când enzima marker este peroxidaza, se pot utiliza trei substrate.

a) Reactiv diaminobenzidinic: se dizolvă 5 mg diamino-benzidină (tetraclorhidrat) în 10 ml soluţie tampon Tris-HCl 0,1 M cu pH = 7,6. Se verifică pH-ul, iar în caz de nevoie se ajustează la 7,6 cu ajutorul unei soluţii de NaOH 1 N. Soluţia obţinută se filtrează, se adaugă 0,1 ml soluţie de H_2O_2 3%, se agită şi se toarnă pe lamă. Se incubează la temperatura laboratorului timp de 8 - 10 minute după care se spală cu apă distilată.

b) 3-Aminoetil-carbazol: se dizolvă 2 mg aminoetil-carbazol în 0,5 ml dimetil-formamidă şi se adaugă imediat 9,5 ml soluţie tampon acid acetic-acetat de sodiu 0,1 M cu pH = 5,0. Se filtrează şi se adaugă 0,1 ml soluţie de H_2O_2 3 %. Timpul de incubare se fixează între 20 şi 60 minute, iar spălarea se face cu apă distilată.

c) 4-Clor-1-naftol: se dizolvă 4 mg cloronaftol în 0,1 ml etanol absolut, se adaugă 10 ml solu-ie tampon Tris-HCl 0,1 M cu pH = 7,6 şi se filtrează, după care se adaugă 0,1 ml soluţie de H_2O_2 3 %. Se toarnă pe lamă, timpul de incubare fiind de 15 minute. Spălarea se face tot cu apă distilată.

Fosfataza alcalină. Când se utilizează fosfataza alcalină în calitate de enzimă marker se foloseşte ca substrat reactivul naftolic cuplat cu un cromogen. Se dizolvă 2 mg de naftol As-Mx (2,4-dimetilamida acidului 3-hidroxi-2-naftoic) în 5 ml soluţie tampon Tris-HCl 0,2 M cu pH = 8,0 (în cazul enzimei din *E.coli)* respectiv 8,2 (pentru enzima din intestinul de vitel). Separat se dizolvă 30 mg *Fast Red* în 5 ml de apă distilată şi se amestecă cele două soluţii, după care se filtrează şi se toarnă pe placă. Timpul de incubare este de 30 minute, iar spălarea se face cu apă distilată.

Glucozoxidaza. Cele mai bune rezultate se obţin atunci când evaluarea activităţii glucozoxidazei în calitate de enzimă marker se face cu ajutorul glucozei în prezenţa unei sări de tetrazoliu în calitate de cromogen.

Se dizolvă 120 mg D-glucoză în 10 ml soluţie tampon Tris-HCl 0,1 M cu pH = 7,2. După dizolvarea completă a glucozei se adaugă succesiv 5 mg MTT [3(4′,5′-dimetiltiazolil-2-)-2,4-difeniltetrazol], 3,5 mg fenazin metosulfat şi 2 mg clorură de cobalt. Se filtrează şi se toarnă pe placă. Incubarea se face timp de 30 minute la întuneric, iar spălarea se face cu apă distilată.

Având la bază procedura experimentală generală descrisă, redăm mai jos două exemple concrete de analiză enzimo-imunocitochimică.

• ***Determinarea anticorpilor anti-ADN în serul bolnavilor de lupus eritematos diseminat***

Reactivi. Se prepară reactivii necesari conform procedurilor generale descrise mai sus.

Modul de lucru. Se folosesc fragmente din ţesutul hepatic de şoarece sau şobolan care se fixează cu etanol sau amestec etanol-acid acetic.

Se incubează fragmentele tisulare timp de 30 minute în soluţie tampon de fosfaţi de potasiu 0,01 M cu pH = 7,4 în soluţie de NaCl 0,15 M cu o serie de diluţii ale serului bolnav realizate cu un ser normal în raport volumetric de 1:10; 1:100; 1:200; 1:400 etc. La sfîrşitul acestui interval de timp se spală cu acelaşi tampon şi se incubează din nou cu anticorpi anti-Ig umani marcaţi cu peroxidază (10 mg/ml), se spală şi se colorează cu un amestec diaminobenzidină-H_2O_2.

Observaţie! Nucleele celulare se colorează în brun în prezenţa serului ce conţine anticorpi anti-ADN şi nu se colorează în cazul serului uman normal. Ultima diluţie a serului analizat ce dă reacţie pozitivă se consideră a fi titrul serului respectiv.

• ***Determinarea simultană a imunoglobulinelor în limfocite cu ajutorul anticorpilor anti- m marcaţi cu peroxidază şi anti-g marcaţi cu fosfatază alcalină.***

a) Obţinerea suspensiei de celule din splină.

Se dezagregă celulele de splină în mediu Hanks după care se spală cu acelaşi mediu şi se centrifughează la +4° C timp de 7 minute la 1.500 r.p.m. Globulele roşii se lizează apoi prin suspendarea precipitatului obținut într-un ml de soluție de clorură de amoniu 0,87 % la rece, agitînd timp de 60 de secunde după care se adaugă 9 ml de mediu Hanks. Suspensia obținută se centrifughează la rece, supernatantul se aruncă, iar precipitatul se resuspendă într-un ml de mediu Hanks după care se ajustează volumul cu acelaşi mediu în aşa fel încât să se obțină o suspensie cu un conținut de $5 \cdot 10^5$ celule / ml.

b) Obținerea suspensiei de celule sanguine.

Se amestecă 2 ml se sânge recoltat pe anticoagulant cu 1 ml *Ficoll-Paque* şi se centrifughează la temperatura laboratorului timp de 30 minute la 1.500 r.p.m. Se recoltează celulele situate la limita dintre cele două faze, se suspendă în 10 ml de mediu Hanks şi se centrifughează din nou (10 minute cu 2.500 r.p.m. la temperatura laboratorului). Precipitatul obținut se spală cu mediu Hanks şi se separă din nou prin centrifugare la +4°C timp de 7 minute la 1.500 r.p.m. Se resuspendă celulele în acelaşi mediu (1 ml) şi se ajustează volumul în aşa fel încât să se obțină o densitate de $5 \cdot 10^5$ celule/ml, după care se prepară un frotiu folosind 0,2 ml din această suspensie. Se usucă la aer timp de 15 - 20 minute. în caz de nevoie se păstrează în exsicator.

c) Marcarea celulelor ce conțin IgM şi IgG.

Se fixează celulele cu p-formaldehidă 4 % timp de 20 minute şi se spală de trei ori cu soluție tampon de fosfați de potasiu 0,01 M cu pH = 7,4 în soluție de NaCl 0,15 M. Se adaugă apoi câte o picătură din soluțiile de anti-g marcate cu fosfatază alcalină şi anti-m marcate cu peroxidază de concentrație 20 şi respectiv 40 µmg / ml. După 1-2 minute se spală din nou de trei ori cu acelaşi tampon. În continuare se realizează reacția pentru peroxidază, se spală cu apă distilată şi apoi reacția pentru fosfatază alcalină. Se spală din nou placa cu apă distilată şi se conservă în glicerol-gelatină.

Observație! Celulele colorate în brun corespund peroxidazei, ele conținînd IgM, iar cele colorate în roşu corespund fosfatazei alcaline şi conțin IgG.

d) Detectarea Ig la suprafața limfocitelor.

Se prepară suspensia de limfocite din splină după metoda descrisă mai sus. Se ajustează apoi volumul suspensiei până la o densitate de $2{,}5 \cdot 10^5$ celule/ ml cu mediu Hanks ce conține 2% albumină serică bovină.

Într-o eprubetă conică se pipetează 50 µl din suspensia astfel obținută, se adaugă 50 µl dintr-o soluție de ser de iepure anti-m sau de șoarece anti-g 50 mg/ml în mediu Hanks și se incubează timp de 30 minute la temperatura laboratorului, agitând periodic. Se separă apoi celulele prin centrifugare la +4°C (7 minute, 1.500 r.p.m.) și se resuspendă în 10 ml mediu Hanks cu 2 % albumină serică bovină.

Celulele astfel obținute pot fi tratate în continuare în două moduri: fie prin citocentrifugare și incubare în prezența conjugatului, fie prin marcare directă.

- *Citocentrifugarea* se face în fracțiuni a câte 0,1 - 0,2 ml după care se usucă în aer. Se fixează cu etanol absolut timp de 10 minute și se usucă din nou. Se rehidratează celulele cu soluție tampon de fosfați de potasiu 0,01 M cu pH = 7,4 în NaCl 0,15 M, se incubează timp de 30 minute în soluție de Fab anti-Ig de iepure marcate cu peroxidază sau fosfatază alcalină (20 mg/ ml în mediu Hanks ce conține 10 % ser de șoarece). Se spală de trei ori cu același tampon, se realizează reacția enzimatică și se spală din nou cu apă distilată după care se conservă în glicerol-gelatină.

- *Marcarea în suspensie.* La suspensia celulară se adaugă 50 ml suspensie Fab anti-Ig de iepure marcate cu peroxidază sau fosfatază alcalină (10 mg/ml în mediu Hanks ce conține 10 % ser de șoarece) și se incubează 30 minute la +4°C agitând periodic. Se separă apoi celulele prin centrifugare, se spală de trei ori cu câte 10 ml de mediu Hanks și se resuspendă în 0,2 ml din soluția substratului specific, transvazând suspensia în altă eprubetă. După 20 -60 minute se fixează celulele între lamă și lamelă.

Observații! 1°Pentru peroxidază se recomandă utilizarea 3-aminoetilcarbazolului, iar trecerea în altă eprubetă este obligatorie pentru a împiedica reacția substratului cu enzima fixată pe pereții eprubetei (când aceasta este din material plastic).

2° În unele cazuri este necesară purificarea conjugatelor prin cromatografie, în sensul înlăturării anticorpilor necuplați de cei marcați enzimatic.

3° Rezultate foarte bune se obțin în cazul aplicării metodei indirecte: în prima fază se folosește un prim set de anticorpi, iar în a doua fragmente Fab anti-Ig marcate cu peroxidază.

În această situație este obligatorie determinarea diluției optime a anticorpilor prin tatonări.

4° Unele țesuturi prezintă o anumită activitate peroxidazică endogenă ce poate fi înlăturată prin tratarea țesutului cu H_2O_2 0,6 % în metanol 80 % timp de 5 minute. Înainte de incubarea în prezența anticorpilor, se spală țesutul cu soluție tampon de fosfați de potasiu 0,01 M cu pH = 7,4 în soluție de NaCl 0,15 M.

X.1.5.8. Sisteme de amplificare a sensibilității metodelor imunoenzimatice

În ultimul timp au fost puse la punct o serie de modificări ale metodelor imunoenzimatice de analiză calitativă şi/sau cantitativă în scopul creşterii sensibilității lor.

Unele din aceste modificări se referă la utilizarea anumitor substrate față de care, aceeaşi cantitate de enzimă determină un semnal mai puternic. Aşa se întîmplă de exemplu în cazul β-galactozidazei în prezența unui substrat fluorogen. O altă modificare constă în creşterea ponderii enzimei în complexul antigen-anticorp-enzimă. Această ultimă modalitate nu poate fi însă utilizată în toate situațiile deoarece există pericolul inactivării enzimei sau anticorpului. Rezultate bune se obțin însă în cazul folosirii sistemelor biotină - avidină şi peroxidază - anti-peroxidază.

- ***Utilizarea unui substrat fluorogen al β-galactozidazei.***

Prin utilizarea acestui substrat fluorogen al β-galactozidazei se măreşte considerabil sensibilitatea dozărilor imunoenzimatice. Astfel, 4-metil-umbeliferil-β-D-galactopiranoza este hidrolizată de către β-galactozidază cu formare de 4-metil-umbeliferonă care emite un semnal fluorescent stabil, foarte puternic. Avantajul utilizării acestui substrat constă, pe de o parte în creşterea considerabilă a sensibilității, iar pe de altă parte, în simplitatea şi rapiditatea execuției. Prin utilizarea acestui substrat ce permite detectarea unor cantități foarte mici de β-galactozidază, s-a pus la punct o micrometodă ce permite dozarea antigenelor în doar 2 - 10 ml de mediu. Această metodă, numită ***TERELISA***, utilizează plăci Terasaki în calitate de suport solid.

Realizarea practică a metodei TERELISA se face în mod identic cu metoda ELISA utilizînd acelaşi conjugat al β-galactozidazei, însă mult mai

diluat (0,5 mg/ml) şi metil-umbeliferil-galactopiranoza în calitate de substrat. Evaluarea fluorescenţei se poate face direct pe plăci. În cazul în care laboratorul nu dispune de aparatură specială, citirea se poate face la un spectrofluorometru utilizînd cuve standard pentru volume mici după diluţia mediului de reacţie.

- ***Utilizarea sistemului avidină-biotină***

Principiul metodei. La baza acestor metode stă interacţiunea puternică şi specifică între biotină şi avidină, complecşii obţinuţi putând substitui complecşii anticorp-enzimă realizaţi prin cuplare chimică.

Biotina este o haptenă care se leagă foarte uşor de grupările aminice libere ale proteinelor, afectând foarte puţin sau de loc proprietăţile imunologice sau catalitice ale acestora. Din această cauză, anticorpii marcaţi cu biotină pot reacţiona cu antigenele specifice, iar complecşii de tipul antigen-anticorp-biotină rezultaţi pot fi ulterior detectaţi prin două metode diferite. Una din ele utilizează avidina ca punte de legătură între anticorp şi enzimă, aceste două componente din urmă fiind marcate cu biotină. Această metodă este cunoscută sub denumirea de ***BRAB (Bridged - avidin - biotin)*** (fig. 177).

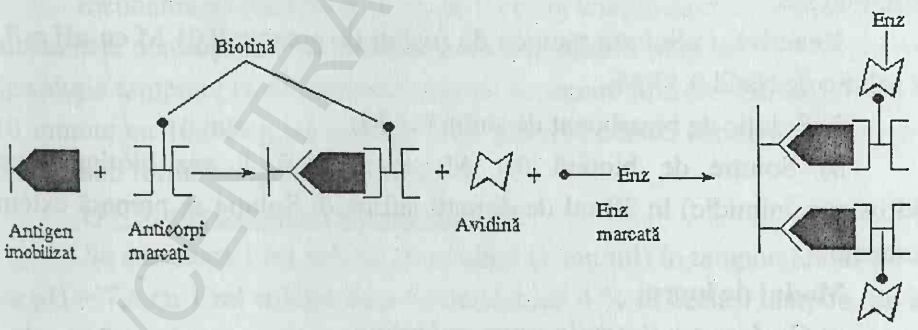


Fig. 177. Determinarea antigenelor prin metoda BRAB (în sistemul avidină-biotină)

Cel de al doilea procedeu constă în utilizarea avidinei marcată cu o enzimă pentru determinarea anticorpilor legaţi de biotină (fig. 178), această metodă fiind cunoscută sub denumirea ***LAB (Labeled - avidin - biotin).***

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

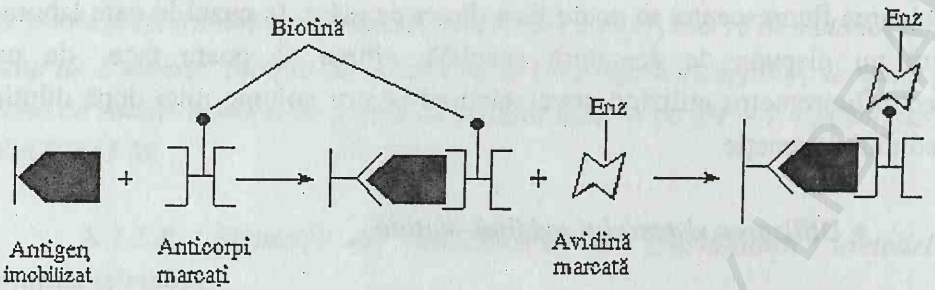


Fig. 178. Determinarea antigenelor prin metoda LAB (în sistemul avidină-biotină)

Chiar şi anticorpii legaţi puternic de biotină îşi conservă capacitatea de a interacţiona cu antigenele. În mod similar, enzimele îşi conservă activitatea catalitică aproape integral. Rezultă că un număr relativ mare de molecule de biotină, fixate pe anticorpi, interacţionează cu un număr mare de molecule de avidină, acestea din urmă fiind cuplate cu numeroase molecule de peroxidază.

În felul acesta, semnalul enzimatic este mult amplificat comparativ cu cel obţinut în cazul utilizării complecşilor anticorp-enzimă în metodele descrise mai sus.

Reactivi. 1) Soluţie tampon de fosfaţi de potasiu 0,01 M cu pH = 7,4 în soluţie de NaCl 0,15 M.

2) Soluţie de bicarbonat de sodiu 0,1 M.

3) Soluţie de biotină 0,1 M: se dizolvă 1 mg biotină (ester hidroxisuccinimidic) în 30 ml de dimetil-sulfoxid. Soluţia se prepară extemporaneu.

Modul de lucru.

a) Cuplarea anticorpilor puri cu biotina.

Se supune dializei timp de 3-4 ore 1 ml soluţie conţinând 2 mg anticorpi/ml faţă de soluţia de bicarbonat de sodiu 0,1 M după care se adaugă 10 ml soluţie de biotină. Se agită 30-60 secunde şi se lasă în repaus la temperatura laboratorului timp de 60 minute. Substanţele nereacţionate se înlătură prin dializă timp de12 ore faţă de soluţia tampon fosfat (1), iar la soluţia obţinută se adaugă un volum egal de glicerol.

b) Cuplarea anticorpilor monoclonali cu biotina.

Se precipită proteinele din 10 - 20 ml de mediu de cultură cu anticorpi monoclonali adăugând soluție saturată de sulfat de amoniu până la obținerea unui grad de saturație de 40 %, se centrifughează și se preia precipitatul cu 1 ml soluție tampon (1). Soluția obținută se supune dializei timp de 3-4 ore față de același tampon, apoi încă alte 3-4 ore față de soluția de bicarbonat de sodiu 0,1 M, după care se adaugă 10 ml soluție de biotină 0,1 M, se agită și se incubează la temperatura laboratorului timp de 60 minute.

Conjugatul obținut se purifică apoi prin dializă față de soluția tampon (1) timp de 10 - 12 ore la +4°C. Pentru conservare se adaugă 0,5 ml glicerol.

c) Cuplarea peroxidazei cu biotina.

Se dizolvă 10 mg peroxidază într-un ml de soluție de bicarbonat de sodiu 0,1 M, se adaugă 50 µl soluție de biotină 0,1 M și se incubează 60 minute la temperatura laboratorului. Complexul obținut se purifică prin dializă față de soluția tampon (1) timp de 10 - 12 ore la +4°C după care se adaugă un volum egal de glicerol pentru conservare.

d) Cuplarea avidinei cu peroxidaza se face cu ajutorul aldehidei glutarice. Pentru aceasta se dizolvă 2,5 mg avidină în 0,5 ml soluție tampon de fosfați de potasiu 0,1 M cu pH = 6,8. Separat se dizolvă 5 mg peroxidază în 0,5 ml din același tampon, după care se amestecă cele două soluții și se adaugă 50 ml glutaraldehidă 1 % în soluție tampon fosfat 0,1 M cu pH = 6,8.

Incubarea se realizează timp de 3 ore la temperatura laboratorului, iar substanțele nereacționate se îndepărtează prin dializă timp de 10 - 12 ore față de soluția tampon (1). Complexul obținut se separă prin centrifugare timp de 10 minute cu 10.000 g, se adaugă 1 ml glicerol pentru conservare și se stochează sub formă congelată la -20°C.

e) Fixarea avidinei cu formaldehidă.

Se amestecă 1 ml soluție de avidină (1 mg/ml) în tampon fosfat 0,1 M cu pH = 7,4 cu 1 ml soluție de p-formaldehidă 4 % în același tampon. Se incubează 2 ore la temperatura laboratorului și se dializează timp de 10 - 12 ore la +4°C față de soluția tampon (1), după care se adaugă 2 ml de glicerol bidistilat.

- **Metodologia generală de lucru (Elisa)**

Această metodă se realizează după tehnica generală descrisă în capitolul X.1.5.3. Se utilizează aceiași reactivi, diluțiile se fac cu soluție de Tween -

gelatină în soluție tampon de fosfați de potasiu 0,01 M cu pH = 7,4 în soluție de NaCl 0,15 M, iar spălările se fac cu soluție de Tween în același tampon.

a) Dozarea antigenelor prin metoda LAB.

Plăcile conținînd anticorpi se saturează cu soluția de gelatină 0,5 % și se spală, după care se incubează timp de 2 ore la 37°C sau 10 ore la +4°C cu diluții succesive ale antigenului ce urmează a se doza. Se spală din nou și se incubează 2 ore la 37°C în soluția conținând complecși anticorp - biotină (1 - 5 mg/ml).

După spălare se realizează o nouă incubare, timp de 30 minute în prezența complexului avidină - peroxidază (1 - 2 mg/ml). Se spală din nou, se adaugă substratul și se procedează în continuare după metodologia descrisă în capitolul X.1.5.3.

b) Dozarea anticorpilor prin procedeul LAB.

Placa activată cu antigene se saturează cu soluție de gelatină 0,5 % după care se spală și se incubează timp de 2 ore la 37°C sau 10 ore la +4°C în prezența unor diluții diferite ale anticorpilor ce urmează a fi dozați. Se spală din nou și se incubează timp de 60 minute la 37°C în prezența aniticorpilor anti-Ig cuplați cu biotină (1 mg/ml). După spălare se realizează a treia incubare (30 minute la 37°C) în prezența avidinei cuplată cu peroxidază (1 mg/ml). Se spală din nou, se adaugă soluția de substrat și se procedează în continuare după metodologia descrisă la capitolul X.1.5.3.

- ***Utilizarea sistemului avidină-biotină în metodele enzimo-imunocitochimice***

Sistemul avidină-biotină se utilizează foarte des în metodele enzimo-imunocitochimice de analiză, modul de lucru fiind cel descris în capitolul X.1.5.8., iar soluțiile de substrat și tampon sunt aceleași. Diluarea reactivilor și spălarea plăcilor se face cu soluție tampon de fosfați de potasiu 0,01 M cu pH = 7,4 în soluție de NaCl 0,15 M.

a) Procedeul BRAB. Fragmentele tisulare fixate în prealabil, se incubează timp de 30 - 60 de minute la 37°C în prezența anticorpilor marcați cu biotină (20 - 50 mg/ml). Se spală de 3 ori și se incubează 15 minute la 37°C în prezența biotinei cuplată cu p-formaldehidă (10 mg/ml). Se spală din nou de 3 ori și se incubează în prezența complecșilor biotină-peroxidază (10 mg/ml) timp de 15 minute la 37°C. După ultima incubare se spală iarăși de 3

ori şi se realizează colorarea cu diaminobenzidină după metoda descrisă la capitolul X.1.5.3.

Observaţie! Se poate utiliza şi o variantă simplificată a acestei metode adăugînd într-o singură etapă complexul avidină-peroxidază-biotină preparat în prealabil prin amestecarea soluţiilor de avidină (5 mg/ml) şi peroxidază-biotină (5 μmg/ml) în raport volumetric de 1:1.

b) Procedeul LAB. Fragmentele tisulare fixate se incubează cu anticorpi marcaţi cu biotină (20 - 50 mg/ml) timp de 60 minute, se spală de 3 ori şi se incubează din nou 30 minute în prezenţa complecşilor avidină-peroxidază (1 - 5 mg/ml). Se spală de 3 ori şi se colorează cu diaminobenzidină după procedura descrisă în capitolul X.1.5.3.

X.2 UTILIZAREA ENZIMELOR ÎN INDUSTRIE

Enzimele se utilizează de multă vreme cu succes în diferite procese de biosinteză. Specificitatea de acţiune a acestora, viteza mare de reacţie, posibilitatea realizării proceselor de biotransformare în condiţii blânde de reacţie, lipsa produşilor secundari indezirabili constituie o parte din factorii care facilitează utilizarea enzimelor în calitate de catalizatori ai multor procese de biotransformare. În organismul viu au loc zeci de mii de reacţii enzimatice diferite. Problema obţinerii anumitor produşi ai acestor reacţii *in vitro* este pe deplin realizabilă.

X.2.1 Utilizarea enzimelor în industria alimentară

Toate ramurile industriei alimentare reprezintă domenii importante de aplicabilitate pentru enzimologie. Multe procese utilizate astăzi în industria alimentară sunt cunoscute de foarte mult timp şi sunt realizate de către microorganisme prin echipamentele lor enzimatice: fermentarea mustului în vinificaţie, oţetirea vinului, fermentarea aluatului în panificaţie, obţinerea brânzeturilor prin fermentaţie lactică etc.

Industria alimentară modernă are la bază procesele clasice, unele din ele cunoscute încă din antichitate, aceste procese fiind modernizate prin diferite modificări printre care şi folosirea unor enzime. Multe firme de prestigiu din industria de panificaţie de exemplu, folosesc diferite preparate enzimati-

ce, în special amilaze şi unele proteinaze, introduse în cocă în concentraţii determinate în vederea îmbunătăţirii caracteristicilor fizice şi organoleptice ale pâinii, iar lipaza este utilizată ca emulgator natural.

Este cunoscut faptul că soluţiile de zaharoză, chiar şi cele concentrate, reprezintă medii optime pentru dezvoltarea unor mucegaiuri şi altor microorganisme. Datorită acestui fapt, produsele de cofetărie au un termen de valabilitate foarte redus.

Pe de altă parte, capacitatea de îndulcire a zahărului invertit (amestec echimolecular de glucoză şi fructoză) este aproape dublă faţă de zaharoza pură. Din această cauză, mierea de albine pură nu este fermentescibilă. Plecând de la aceste considerente, în industria de cofetărie se utilizează cu succes **invertaza** care hidrolizează zaharoza cu formare de zahăr invertit mult mai dulce, nefermentescibil şi cu o solubilitate crescută. Se realizează totodată importante reduceri ale consumului de zahăr. Aceeaşi enzimă se utilizează şi la fabricarea mierii artificiale ca înlocuitor al mierii de albine.

Fabricarea berii prin utilizarea glucozei ca materie primă ar creşte enorm preţul de cost al acestui produs. De aceea se foloseşte ca materie primă amidonul, mult mai ieftin, îmbogăţind mediul de fermentaţie cu ***α–amilază*** sub formă de malţ. Unele firme folosesc şi ***proteinaze*** pentru scindarea hidrolitică a proteinelor care conferă un anumit grad de turbiditate al berii. Hidroliza acestor proteine până la aminoacizi limpezeşte berea şi conferă un gust uşor dulce prin aminoacizii formaţi.

Coagularea laptelui în industria brânzeturilor se realizează cu ajutorul **reninei** datorită acţiunii sale proteolitice. Determinarea activităţii unor enzime (dehidrogenaza totală, fosfatazele, peroxidazele, amilazele etc.) este utilizată în determinarea gradului de pasteurizare a laptelui. Marea diversitate a brânzeturilor obţinute de diferite firme din industria laptelui este datorată nu numai utilizării diferitelor tulpini microbiene ci şi unor prelucrări enzimatice specifice.

În ţările aflate în curs de dezvoltare din zonele călduroase ale globului, din raţionamente economice este imposibilă efectuarea transportului laptelui de la producători la firmele de prelucrare în autocisterne frigorifice. Temperatura crescută a mediului ambiant, precum şi faptul că laptele constituie un substrat ideal pentru multiplicarea microorganismelor, determină o încărcare microbiană a acestuia. Adăugarea perhidrolului (1-5 ml la fiecare 100 l de lapte) împiedică contaminarea microbiană, laptele ajungând la firmă aproape

steril. Deoarece catalaza din lapte este insuficientă pentru descompunerea H_2O_2 se adaugă mici cantități de catalază pură înainte ca laptele să intre în procesele tehnologice.

Şi alte domenii ale industriei alimentare beneficiază de aportul enzimelor pentru îmbunătățirea calității produselor: industria cărnii, industria furajelor sub forma concentratelor vitamino-proteice, industria băuturilor răcoritoare etc.

X.2.2 Utilizarea enzimelor în industria farmaceutică

Industria chimico-farmaceutică poate folosi diferite preparate enzimatice în două scopuri:

- obținerea de preparate farmaceutice sub formă de tablete, unguente etc. conținând diferite enzime „medicament" utilizate în tratament (vezi X.1.2);
- utilizarea enzimelor în diferite procese de sinteză şi semisinteză în vederea obținerii de noi medicamente. Un exemplu concret în acest sens îl reprezintă utilizarea **penicilinazei**. Este cunoscut faptul că utilizarea repetată a penicilinei determină apariția fenomenului de rezistență care constă în inducerea biosintezei penicilinazelor de către flora microbiană din tubul digestiv. Pentru a evita apariția acestui fenomen, este necesară înlocuirea periodică a tratamentului clasic prin utilizarea altor peniciline. Pentru aceasta se fabrică penicilina clasică prin procedeele cunoscute după care aceasta este supusă acțiunii penicilinazelor din *Escherichia coli* cu obținerea în final de ***acid 6-aminopenicilanic***. Prin condensarea şi esterificarea acestuia cu diferiți compuşi se obțin penicilinele de semisinteză care nu sunt recunoscute de penicilinaze.

X.2.3 Utilizarea enzimelor în alte domenii

Şi alte ramuri industriale beneficiază de utilizările practice ale enzimologiei. Astfel în ***industria chimică*** s-au făcut paşi importanți în obținerea aşa numiților biodetergenți cu calități de înmuiere şi spălare superioare. Aceştia conțin atât substanțe tensioactive cât şi unele enzime (lipaza, diferite proteinaze, amilaze) care, prin acțiunea lor hidrolitică asupra impurităților de natură lipidică, proteică şi glucidică, măresc considerabil capacitatea de spă-

lare. Prin utilizarea transferazelor au putut fi obținute noi substanțe organice care se obțin greu prin sinteză organică şi în stare impură. În mod similar a devenit posibilă separarea antipozilor optici din amestecurile racemice sub acțiunea izomerazelor specifice.

Utilizarea enzimelor în ***industria pielăriei*** se bazează pe faptul că pieile de animale folosite ca materii prime sunt produse biologice, iar diferitele tratamente enzimatice pot completa procesele chimice de prelucrare în aşa fel încât să se obțină produse finale cu calități superioare.

Nu lipsite de interes sunt implicațiile enzimelor în procesele de ***epurare a apelor reziduale***, epurarea biologică fiind tot mai mult preferată. Enzimele îşi găsesc o largă aplicabilitate şi în ***microbiologie***. Microorganismele se cultivă pe diferite medii de cultură în vederea obținerii unei game variate de substanțe organice. Introducerea în mediul de cultură a unui substrat induce biosinteza enzimei ce catalizează transformarea acestuia.

X.3 APLICAȚIILE PRACTICE ALE ENZIMELOR IMOBILIZATE

Utilizarea enzimelor imobilizate în diferite domenii ale activității umane prezintă o serie de avantaje certe comparativ cu enzimele libere. În primul rând este posibilă folosirea repetată a aceluiaşi biocatalizator în realizarea mai multor cicluri de transformare. Pe de altă parte se obțin produşi de reacție mult mai puri, nefiind nevoie de anumite etape costisitoare de purificare. Prin utilizarea enzimelor imobilizate în scop terapeutic se evită, în primul rând, degradarea acestora sub acțiunea enzimelor din tubul digestiv sau tisulare. În ultimul timp au fost realizate o serie de cercetări ingenioase asupra imobilizării enzimelor de interes terapeutic în fantome eritrocitare sau în diferite structuri subcelulare, fiind complet înlăturat fenomenul de incompatibilitate. Au mai fost efectuate cercetări asupra includerii enzimelor în unguente, comprese şi medicamente cu aplicație locală.

Rezultate spectaculoase s-au obținut în domeniul senzorilor enzimatici care pot fi folosiți ca orice alt electrod ionoselectiv. În principiu, aceşti senzori sunt reprezentați de electrozi sensibili față de diferiți compuşi chimici, ce au suprafața activă acoperită cu o peliculă sintetică în care s-au imobilizat în prealabil una sau mai multe enzime. De exemplu senzorul pentru dozarea glucozei în diferite medii este format dintr-un electrod de oxigen acoperit cu o peliculă în care s-a imobilizat prin reticulare glucozooxidaza şi catalaza. În

procesul de exploatare are loc o oxidare a glucozei cu formare de acid gluconic şi apă oxigenată. Aceasta din urmă este descompusă de catalază cu formarea unei cantităţi stoechiometrice de oxigen ce poate fi dozat de oxigenometru. Aparatul poate fi gradat direct în unităţi ale concentraţiei de glucoză dacă se ţine cont de stoechiometria transformărilor.

Multe firme de renume (*Orion, Corning, Sorgent* ş.a.) produc deja senzori enzimatici pentru determinarea ureei, aminoacizilor, penicilinei etc. În funcţionarea unui senzor enzimatic se disting cinci faze :

- contactarea suprafeţei active a senzorului de către substrat;
- difuzia moleculelor substratului prin reţeaua polimerului şi accesul acestora la centrul activ al enzimei;
- reacţia enzimatică propriu-zisă;
- „exportul" produsului de reacţie prin membrana senzorului spre suprafaţa activă a electrodului de bază;
- evaluarea concentraţiei acestuia la suprafaţa electrodului. În tabelul XIV sunt sistematizate principalele date din literatură privind utilizarea senzorilor enzimatici.

Tabel XIV

Principalii senzori enzimatici şi caracteristicile lor

Nr. crt.	Substanţa dozată	Enzima din senzor	Stabilitate senzor	Timp de lucru	Sensibilitatea (moli/l)
1	uree	urează	3 săpt.	30 sec.	10^{-2}-10^{-5}
2	glucoză	glucozooxidază	6 luni	15 sec.	10^{-2}-10^{-4}
3	aminoacizi	oxidaze specifice	6 luni	15 sec.	10^{-3}-10^{-5}
4	acid lactic	LDH	1 săpt.	3 min.	10^{-3}-10^{-4}
5	acid succinic	succinat-DH	1 lună	1 min.	10^{-2}-10^{-4}
6	acid acetic	alcool-DH	5 luni	30 sec.	10^{-1}-10^{-4}
7	penicilină	penicilinaza	3 săpt.	1 min.	10^{-2}-10^{-4}
8	acid uric	uratoxidaza	4 luni	30 sec.	10^{-2}-10^{-4}
9	colesterol	colesteroloxidaza	3 luni	2 min.	10^{-1}-10^{-4}

BCU CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

BIBLIOGRAFIE

1. Ameisen, J.C., Idziorek, T., Billaut-Mulot, O., Loyens, M., Tissier, J.P., Potentier, A., Ouiassi, A. – 1995, *Apoptosis in an unicellular eucaryote (Trypanosoma cruzi) : implication for the evolutionary origin and the role of programmed cell death in the control of cell proliferation*, Cell Death Differ 2, pp. 285 – 300.
2. Amess, B. şi Tolkovsky, A.M. – 1995, *Programmed cell death in sympathetic neurons: a study by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis using computer image analysis*, Electrophoresis 16, pp. 1255 – 67.
3. Artenie, Vl. – 1971, *Curs de chimie biologică*, vol.I, Ed. Univ."Al. I. Cuza", Iaşi.
4. Artenie, Vl. – 1991, *Biochimie*, Ed. Univ. "Al. I. Cuza", Iaşi.
5. Artenie, Vl., Cojocaru D.C., Comănescu Şt. – 1992, *Imobilizarea prin legare covalentă a tripsinei pe schimbători de ioni de tip Ponilex*, Microbiol. ind. & Biotehnol., vol. VII, Iaşi, pp. 117 – 122.
6. Artenie, Vl., Cojocaru, D.C. – 1990, *Comparative evaluation of catalase immobilization methods on different supports,* Twelfth Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals, Gatlinburg, Tennessee, USA, p. 21.
7. Artenie, Vl., Cojocaru, D. C. – 1990, *Comparative evaluation of catalase immobilization methods on different supports*, in: The 8th Balkan Biochemical and Biophysical Days, Cluj-Napoca, p. 17.
8. Barbier, Y. – 1989, *Les immunodosages de la théorie à la pratique*, Edition de l'ACOMEN, Lyon.
9. Bănăţeanu, D. Schell, H.D., Drobotă S., Lazăr, I., Grigoriu-Voicu A., Benţia, T., Velehorschi V. – 1988, *Aspecte privind procedee de imobilizare a asparaginazei din Escherichia coli pe derivaţi ai xanthanului*, Microbiol. ind. & Biotehnol., vol. VI, Iaşi, pp. 21 – 26.
10. Bergeron, L., Perez, G.I., Macdonald, G., Shi, L., Sun, Y., Jurisicova, A., Varmuza, S., Latham, K.E., Flaws, J.A., Salter, J.C., Hara, H., Moskowitz, M.A., Li, E., Greenberg, A., Tilly, J. L., Yuan, J. – 1998, *Defects in regulation of apoptosis in caspase-2-deficient mice,* Genes Dev 12, pp. 1304 – 1314.

BCU Cluj / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

11. Beynon, R.J., Bond, J.S. (ed. by) – 1990, *Proteolytic enzymes*, IRL Press, Oxford Univ. Press.
12. Bicknell, G.R., Cohen, G.M. – 1995, *Cleavage of DNA to large kilobase pair fragments occurs in some forms of necrosis as well as apoptosis*, Biochem. Biophys. Res. Commun. 207, pp. 40 – 47.
13. Bouquelet, St. – 1996, L'école d'été franco-roumaine de biochimie, Iaşi, 14 – 28 sept.
14. Chibata, I. – 1978, *Immobilized Enzymes*, Research and Development, Tokyo.
15. Chinnaiyan, A.M., O'Rourke, K., Lane, B.R., Dixit, V.M. – 1997, *Interaction of CED-4 with CED-3 and CED-9: a molecular framework for cell death*, Science 275, pp. 1122 – 1126.
16. Chinnaiyan, A.M., O'Rourke, K., Tewari, M., Dixit, V.M. – 1995, *FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis*, Cell 81, pp. 505 – 512.
17. Clottes, E., Vial, Ch. – 1993, Regard sur la Biochimie, N. 1, pp. 37 – 43.
18. Cojocaru D.C., Topală, N.D. – 1985, *Imobilizarea invertazei pe anioniţi de tipul Ponilex AS*, An. St.Univ. "Al.I.Cuza", Iaşi, tom XXXI, s. II-a Biol., pp. 97 – 100.
19. Cojocaru D.C., Topală, N.D., Stanciu A.S. – 1986, *Cercetări privind hidroliza enzimatică a amidonului cu ajutorul preparatelor de taka-diastază şi amiloglucozidază imobilizate*, Microbiol.&Biotehnol., vol.V, Iaşi, pp. 61 – 64.
20. Cojocaru, D.C. – 2005, *Enzimologie practică*, Ed. TEHNOPRESS, Iaşi.
21. Cojocaru, D.C. – 1986, *Cercetări experimentale privind aspectul ontogenetic al activităţii adenozintrifosfatazei mitocondriale din ficatul şi miocardul de şobolan*, An. Şt. Univ. "Al.I.Cuza", Iaşi, tom XXXII, s.II-a Biol., pp. 104 – 108.
22. Cojocaru, D.C. – 1992, *Cercetări experimentale privind determinarea unor caracteristici cinetico-chimice şi funcţionale ale invertazei imobilizate prin metode chimice*, Microbiol. ind. & Biotehnol., vol. VII, Iaşi, pp. 87 – 92.
23. Cojocaru, D.C. – 1992, *Cercetări privind imobilizarea prin metode chimice a amiloglucozidazei microbiene pe suporturi solide*, Microbiol. ind. & Biotehnol., vol. VII, Iaşi, pp. 99 – 103.
24. Cojocaru, D.C. – 1992, *Imobilizarea alfa-amilazei bacteriene pe suporturi solide prin reticulare cu glutaraldehidă*, Microbiol. ind. & Biotehnol., vol. VII, Iaşi, pp. 105 – 110.

BCU IAŞI CENTRALA UNIVERSITARĂ LIBRARY

25. Cojocaru, D.C. – 1992, *Studiul comparativ al caracteristicilor cinetice şi funcţionale ale ureazei bacteriene imobilizate prin metode diferite*, Microbiol. ind. & Biotehnol., vol. VII, Iaşi, pp. 199 – 204.
26. Cojocaru, D.C. – 1992, *Unele proprietăţi ale papainei imobilizate prin adsorbţie pe anioniţi de tip Ponilex*, Microbiol. ind. & Biotehnol., vol. VII, Iaşi, pp. 77 – 80. Cojocaru, D. C. – 1997, Enzimologie, Ed. GAMA, Iaşi
27. Cojocaru; D. C. – 1997, *Enzimologie*, Ed. GAMA, Iaşi
28. Cojocaru, D.C. – 1996, *Biochimia vitaminelor*, Ed. GAMA, Iaşi.
29. Cojocaru, D.C., Topală, N.D. – 1988, *Studiul comparativ al caracteristicilor cinetico-chimice ale alfa-amilazei termostabile imobilizate prin legare covalentă şi adsorbţie pe schimbători de ioni*, Microbiol. ind. & Biotehnol., vol.VI, Iaşi, pp. 69 – 74.
30. Conen, G. – 1971, *Le métabolisme cellulaire et sa régulation*, Hermann Collection, Paris
31. Copeland, R.A. – 2000, *Enzymes: A Practical Introduction to Structure, Mechanism and Data Analysis*, John Wiley & Sons, Inc., New York.
32. Cortassa, S., Aon, M.A., Iglesias, A. A. – 2002, *An Introduction to Metabolic and Cellular Engineering*, World Scientific Publishing Co.
33. Creighton, T.E. – 1999, *Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc., New York.
34. Crocker, J., Murray, P.G. – 2003, *Molecular Biology in Cellular Pathology*, John Wiley & Sons, Inc., New York.
35. Crowther, J.R. – 2001, *Methods in Molecular Biochemistry*, vol. 149, The ELISA Guidebook, Humana Press, Totowa, New Jersey.
36. Cullis, Ch.A. – 2004, *Plant Genomics and Proteomics*, John Wiley & Sons, Inc., New York.
37. Dixon, M., Webb, E.C. – 1964, *Enzymes*, Longmans, London.
38. Dong, Z., Saikumar, P., Weinberg, J.M., and Venkatachalam, M.A. – 1997, *Internucleosomal DNA cleavage triggered by plasma membrane damage during necrotic cell death. Involvement of serine but not cysteine proteases*, Am. J. Pathol., 151, pp. 1205 – 1213.
39. Dumitru, I.F. – 1980, *Biochimie*, Ed. Did. şi Ped., Bucureşti.
40. Dumitru, I.F., Iordăchescu, Dana –1981, *Introducere în enzimologie*, Ed. Medicală, Bucureşti.
41. Durand, G., Monsa, P., Hernando, D. – 1970, *Les enzymes immobilisées*, Ser. synth. bibl., 5.
42. Duvale E., Wyllie A.H. – 1985, *Death and cell, Immunology today*, 7 (4), pp. 115 – 119.

43. Earnshaw, W.C., Martins, L. M., Kaufmann, S.H. – 1999, *Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis,* Annu. Rev. Biochem. 68, pp. 383 – 424.
44. Fogarty, W.M. – 1983, *Microbial Enzymes and Biotechnology*, Appl. Sci. Publ., London, New York.
45. Gerner, C., Seelos, C., Sauermann, G. – 1998, *Alteration of nuclear matrix protein composition during apoptosis in rat embryo cells*, Exp. Cell Res. 238, pp. 472 – 480.
46. Goldberg, S. – 1999, *Clinical Biochemistry*, MedMaster, Inc., Miami.
47. Gregoriadis, G., Ryman, H.R. – 1972, Eur. J. Biochem., vol. 24, pp. 485 – 491.
48. Grunwald; P. – 2007, *Biochemical fundamentals and Applications*, World Scientific Publishing Co.
49. Hakem, R., Hakem, A., Duncan, G.S., Henderson, J.T., Woo, M., Soengas, M.S., Elia, A., de la Pompa, J.L., Kagi, D., Khoo, W., Potter, J., Yoshida, R., Kaufman, S.A., Lowe, S.W., Penninger, J.M., Mak, T.W. – 1998, *Differential requirement for caspase 9 in apoptotic pathways in vivo*, Cell 94, pp. 339 – 352.
50. Hengartner, M. O., Horvitz, H. R. – 1994, *Programmed cell death in Caenorhabditis elegant.* Curr. Opin. Genet. Dev. 4, pp. 581 – 586.
51. Hermann, M., Kalden, J. R. – 2003, *Apoptosis and Autoimmunity*, John Wiley & Sons, Inc., New York.
52. Hiram, F. G. – 2000, *Basic Concepts in Biochemistry*, McGraw-Hill, New York.
53. Hockenbery, D. – 1994, *Bcl-2 in cancer, development and apoptosis*, J. Cell Sci., 18 (1): pp. 51 – 55.
54. Hofmann, K., Bucher, P., Tschopp, J. – 1997, *The CARD domain: a new apoptotic signalling motif*, Trends Biochem. Sci. 22, pp. 155 – 156.
55. Howard, A.D., Kostura, M.J., Thornberry, N., Ding, G.J., Limjuco, G., Weidner, J., Salley, J.P., Hogquist, K.A., Chaplin, D.D., Mumford, R.A.– 1991, *IL-1-converting enzyme requires aspartic acid residues for processing of the IL-1 beta precursor at two distinct sites and does not cleave 31-kDa IL-1 alpha*, J Immunol 147, pp. 2964 – 2969.
56. Hsu, H., Xiong, J.,Goeddel, D.V. – 1995, *The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation*, Cell 81, pp. 495 – 504.
57. Kaufmann, S.H. – 1989, *Induction of endonucleolytic DNA cleavage in human acute myelogenous leukemia cells by etoposide,*

camptothecin, and other cytotoxic anticancer drugs: a cautionary note, Cancer Res 49, pp. 5870 – 5878.

58. Kehr J.F.R. – 1971, *Shrinkage necrosis: a distinct mode of cellular death*, J. Pathol., 107 (1), pp. 217 – 219.
59. Kerr, J.F., Wyllie, A.H., Currie, A.R. – 1972, *Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics*, Br. J. Cancer 26, pp. 239 – 257.
60. Kluck, R.M., Bossy-Wetzel, E., Green, D.R., Newmeyer, D.D. – 1997, *The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis*, Science 275, pp. 1132 – 1136.
61. Kolev, D. – 2007, *Enzymology*, World Scientific Publishing Co.
62. Koolman, J., Roehm, K. H. – 2005, *Color Atlas of Biochemistry*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
63. Kuida, K., Haydar, T.F., Kuan, C.Y., Gu, Y., Taya, C., Karasuyama, H., Su, M.S., Rakic, P., Flavell, R.A. – 1998, *Reduced apoptosis and cytochrome c-mediated caspase activation in mice lacking caspase 9,* Cell 94, pp. 325 – 337.
64. Kuida, K., Lippke, J.A., Ku, G., Harding, M.W., Livingston, D.J., Su, M. S., Flavell, R. A. – 1995, *Altered cytokine export and apoptosis in mice deficient in interleukin-1 beta converting enzyme*, Science 267, pp. 2000 – 2003.
65. Kuida, K., Zheng, T.S., Na, S., Kuan, C., Yang, D., Karasuyama, H., Rakic, P., Flavell, R. A. – 1996, *Decreased apoptosis in the brain and premature lethality in CPP32-deficient mice,* Nature 384, pp. 368 – 372.
66. Langois, N.E.I., Eremin O., Heys S.D. – 2000, *Apoptosis and prognosis in cancer: rationale and relevance*, Roy. Coll. Surg. Edinb., 45 (4), pp. 211 – 219.
67. Leskovac, V. – 2004, *Comprehensive Enzyme Kinetics*, Kluwer Academic Publishers, New York, Boston, London, Moskow.
68. Maarouf, M., de Kouchkovsky, Y., Brown, S., Petit, P. X., Robert-Gero, M. – 1997, *In vivo interference of paromomycin with mitochondrial activity of Leishmania*, Exp. Cell Res, 232, pp. 339 – 48.
69. Majno G., Joris I. – 1995, *Apoptosis, oncosis and necrosis*, Am. J., Pathol., p. 146.
70. Marchetti, P., Hirsch, T., Zamzami, N., Castedo, M., Decaudin, D., Susin, S. A., Masse, B., Kroemer, G. – 1996, *Mitochondrial permeability transition triggers lymphocyte apoptosis*, J. Immunol. 157, pp. 4830 – 4836.
71. Maxim S., Flondor A., Carpov, A., Rugină, V., Cojocaru, D.C., Bontaş, I., Topală, N. – 1986, *Functionalized cross linked*

acrylic copolymers as supports for biologically active proteins, Biotechnology and Bioengineering, John Willey and Sons, New York, vol. XXVIII, pp. 294 – 296.

72. Messing, R.A. – 1975, *Immobilized Enzymes for Industrial Reactors*, Acad. Press, New York.
73. Metzler, D.E. – 1977, *Biochemistry. The chemical reactions of living cells*, Acad. Press Inc., New York.
74. Moo-Young, M. – 1980, *Advances in Biotechnology*, Pergamon Press, New York.
75. Murray, R., Granner, D.K., Mayes, P.A., Rodwell, V.W. – 2003, *Harpers Illustrated Biochemistry*, McGraww-Hill Companies, Inc., New York.
76. Nakagawa, T., Zhu, H., Morishima, N., Li, E., Xu, J., Yankner, B.A., Yuan, J. – 2000, *Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta*, Nature 403, pp. 98 – 103.
77. Ooshima, H., Genko, Y., Harano, Y. – 1981, Biotechnol. & Bioeng., vol. 23, pp. 2851–2863.
78. Păunescu V. – 2006, *Aspecte actuale în carcinogineza colo-rectală*, Rolul apoptozei, Jurnalul de Chirurgie, Iaşi, V.II, pp. 344 – 351.
79. Pelmont, Y. – 1989, *Enzymes*, Presses Universitaires de Grenoble.
80. Plummer; D. T. – 1994, *Techniques de Biochimie*, Ediscience International, Paris.
81. Ricci, J. E. – 1990, *Les mécanismes moléculaires de l'apoptose*, 123 bionet, Biologie et Recherche.
82. Robaye, B., Doskeland, A.P., Suarez-Huerta, N., Doskeland, S.O., Dumont, J.E. – 1994, *Apoptotic cell death analyzed at the molecular level by two-dimensional gel electrophoresis*, Electrophoresis 15, pp. 503 – 10.
83. Rosetti-Coltoiu, M., Oţeleanu, D. – 1980, *Biocatalizatorii în practica medicală şi farmaceutică*, Ed. Med., Bucureşti.
84. Ryu, D.D.K., Kim, H.S., Taguchi, H. – 1984, J. Ferment. Technol., n. 3, pp. 255 – 261.
85. Salmona, M., Saronio, C., Garattini, S. – 1974, *Insolubilized Enzymes*, Raven Press, New York.
86. Sanchez, J.C., Corthals, G., Hochstrasser, D.F. – 2004, *Biomedical Application of Proteomics*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.
87. Schell H.D., Tudor, R. – 1987, *Influenţa condiţiilor de mediu asupra activităţii invertazice a celulelor de Saccharomyces cerevisiae imobilizate şi libere*, St. cercet. Biochim., vol. 30, n. 1, pp. 55 – 60.

BCU IAŞI

88. Schell, H.D., Vintilă, V., Mihăescu, A., Tassopoulos, P. – 1986, St. Cercet. Biochim., vol. 29, n. 1, pp. 69 – 74.
89. Scriban, R. – 1993, *Biotechnologie*, 4-e édition, Tec.Doc., Lavoisier, Paris.
90. Sewald, N., Jakubke, H.D. – 2002, *Peptides: Chemistry and Biology*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.
91. Shimomura, O. – 2006, *Bioluminescence, Chemical Principles and Methods*, World Scientific Publishing Co.
92. Sleath, P.R., Hendrickson, R.C., Kronheim, S.R., March, C.J., Black, R.A. – 1990, *Substrate specificity of the protease that processes human interleukin-1 beta*, J. Biol. Chem. 265, pp. 14526 – 14528.
93. Smith, C.M., Marks, A.D., Lieberman, M.A. – 2005, *Basic Medical Biochemistry: A Clinical Approach*, Lippincott Williams & Wilkins, New York.
94. Stennicke, H.R., Deveraux, Q.L., Humke, E.W., Reed, J.C., Dixit, V.M., Salvesen, G.S. – 1999, *Caspase-9 can be activated without proteolytic processing*, J. Biol. Chem. 274, pp. 8359 – 8362.
95. Thompson, C.B. – 1995, *Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease*, Science 267, pp. 1456 – 1462.
96. Topală, N.D., Cojocaru, D.C., Ailiesei Octăvița – 1985, *Immobilization Exoproteinases Producing Cells of Sarcina lutea,* în: Rev. Roum. Biol., Biol. Anim, tom 30, nr. 2, pp. 167 – 173.
97. Topală, N.D., Artenie, Vl., Cojocaru D.C. – 1988, *Unele caracteristici ale catalazei imobilizate prin legare covalentă pe suporturi macromoleculare*, Microbiol. ind. & Biotehnol., Iaşi, vol. VI, pp. 87 – 93.
98. Topală, N.D., Cojocaru, D.C. – 1984, *Cercetări privind utilizarea celulelor de Saccharomyces cerevisiae imobilizate prin entrapare pe copolimer acrilamidă-anhidridă maleică-metilenbisacrilamidă*, An. Şt. Univ. Al .I. Cuza Iaşi, tom XXXI, s. II a Biol., pp. 66 – 70.
99. Topală, N.D., Cojocaru, D.C., Artenie, Vl. – 1986, *Imobilizarea enzimelor, organitelor celulare şi a celuleor microbiene. Stadiu actual şi perspective*, Microbiol. ind. & Biotehnol., Iaşi, vol.V, pp. 17 – 26.
100. Valpuesta, V. – 2002, *Fruit and vegetable biotechnology*, CRC Press, New York.
101. Varcoe, J.S. – 2001, *Clinical Ciochemistry: Techniques and Instrumentation*, World Scientific Publishing Co.

102. Varfolomeev, E.E., Schuchmann, M., Luria, V., Chiannilkulchai, N., Beckmann, J.S., Mett, I.L., Rebrikov, D., Brodianski, V.M., Kemper, O.C., Kollet, O., Lapidot, T., Soffer, D., Sobe, T., Avraham, K.B., Goncharov, T., Holtmann, H., Lonai, P., Wallach, D. – 1998, *Targeted disruption of the mouse Caspase 8 gene ablates cell death induction by the TNF receptors, Fas-Apo1, and DR3 and is lethal prenatally*, Immunity 9, pp. 267 – 276.

103. Viratelle, O. – 1974, *Enzymologie*, Hermann Collection, Paris.

104. Voet, D., Voet, J.G. – 1990, *Biochemistry*, John Wiley & Sons, New York.

105. Walker, N. P., Talanian, R.V., Brady, K.D., Dang, L.C., Bump, N.J., Ferenz, C. R., Franklin, S., Ghayur, T., Hackett, M.C., Hammill, L.D. – 1994, *Crystal structure of the cysteine protease interleukin-1 beta-converting enzyme: a (p20/p10)2 homodimer*, Cell 78, pp. 343 – 352.

106. Wang, K. K., Posmantur, R., Nadimpalli, R., Nath, R., Mohan, P., Nixon, R. A., Talanian, R.V., Keegan, M., Herzog, L., Allen, H. – 1998, *Caspase-mediated fragmentation of calpain inhibitor protein calpastatin during apoptosis*, Arch. Biochem. Biophys. 356, pp. 187 – 196.

107. White, E. – 1996, *Life, death, and the pursuit of apoptosis*, Genes Dev. 10, pp. 1–15.

108. Wingard, L.B. – 1972, *Enzyme engineering*, John Wiley &Sons, New York.

109. Woo, M., Hakem, R., Soengas, M.S., Duncan, G.S., Shahinian, A., Kagi, D., Hakem, A., McCurrach, M., Khoo, W., Kaufman, S.A., Senaldi, G., Howard, T., Lowe, S.W., Mak, T.W. – 1998, *Essential contribution of caspase 3/CPP32 to apoptosis and its associated nuclear changes*, Genes Dev. 12, pp. 806 – 819.

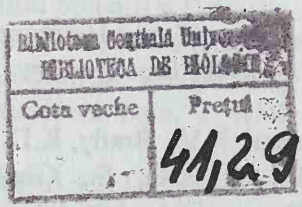
110. Woodward, J. – 1987, *Immobilized Cells and Enzymes*, A. Practical Approach, IRL Press, Oxford, Washington D.C.

111. Wyllie, A.H. – 1980, *Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation*, Nature 284, pp. 555 – 556.

112. Wyllie, A.H., Morris, R.G., Smith, A.L., Dunlop, D. – 1984, *Chromatin cleavage in apoptosis: association with condensed chromatin morphology and dependence on macromolecular synthesis*, J. Pathol. 142, pp. 67 – 77.

113. Yuan, J., Shaham, S., Ledoux, S., Ellis, H.M., Horvitz, H.R. – 1993, *The C. elegans cell death gene ced-3 encodes a protein similar to mammalian interleukin-1beta-converting enzyme*, Cell 75, pp. 641 – 52.

114. Zarnea, G., Mencinicopschi, Gh., Brăgărea, Şt. – 1980, *Bioingineria preparatelor enzimatice microbiene*, Ed. Tehnică, Bucureşti.
115. Zöllner, N. – 1972, Rev. Progr. Thérap., vol. 24, pp. 963 – 973.
116. Березин, И. В., Мартинек, К. – 1982, Введение в прикладную энзимологию, Изд-во Моск. Унив., Москва.



BCU IAŞI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

CUPRINS

	PREFAȚĂ	3
I.	SCURT ISTORIC AL DEZVOLTĂRII ENZIMOLOGIEI	5
II.	NOȚIUNI GENERALE	8
II.1	PROPRIETĂȚI GENERALE ALE ENZIMELOR	8
II.1.1	Specificitatea de reacție	9
II.1.2	Specificitatea de substrat	11
II.2	NOMENCLATURA ŞI CLASIFICAREA ENZIMELOR	15
II.2.1	Nomenclatura enzimelor	15
II.2.2	Nomenclatura precursorilor enzimatici	16
II.2.3	Clasificarea enzimelor	17
II.2.3.1	Caracterizarea clasei oxidoreductazelor	25
II.2.3.2	Caracterizarea clasei transferazelor	34
II.2.3.3	Caracterizarea clasei hidrolazelor	43
II.2.3.4	Caracterizarea clasei liazelor	82
II.2.3.5	Caracterizarea clasei izomerazelor	94
II.2.3.6	Caracterizarea clasei ligazelor (sintetazelor)	97
II.3	STRUCTURA CHIMICĂ A ENZIMELOR	103
II.3.1	Aminoacizii - unități structurale de bază ale enzimelor	103
II.3.2	Structura enzimelor	106
II.3.3	Centrul activ al enzimelor	119
II.3.4	Centrul alosteric. Enzime alosterice	122
II.3.5	Domenii structurale	127
II.3.6	Enzime membranare	131
III	COENZIME	139
III.1	GENERALITĂȚI	139

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

III.2	**COENZIME DE NATURĂ ALIFATICĂ**	140
III.2.1	Glutationul	140
III.2.2	Acidul lipoic	142
III.2.3	Acidul ascorbic	149
III.3.	**COENZIME DE NATURĂ AROMATICĂ**	152
III.4	**COENZIME DE NATURĂ HETEROCICLICĂ**	155
III.4.1	Coenzime derivate de la tiamină	155
III.4.2	Coenzime derivate de la biotină	158
III.4.3	Coenzime derivate de la piridoxină	165
III.4.4	Coenzime derivate de la acidul folic	174
III.5	**COENZIME DERIVATE DE LA NUCLEOZIDE**	177
III.5.1	Nucleozidfosfații	177
III.5.2	Coenzima A	180
III.5.3	Coenzime piridin-nucleotidice	182
III.5.4	Coenzime flavinice	191
III.5.5	Coenzimele cobamidice	199
III.5.6	Cofactori feroporfirinici	202
III.5.7	Feredoxinele	222
IV	**CINETICA REACȚIILOR ENZIMATICE**	229
IV.1	NOȚIUNI GENERALE DE TERMODINAMICĂ ENZIMATICĂ	229
IV.2	INFLUENȚA UNOR FACTORI FIZICO-CHIMICI ASUPRA VITEZEI REACȚIILOR ENZIMATICE	232
IV.2.1	Influența concentrației enzimei asupra vitezei de reacție	232
IV.2.2	Influența concentrației substratului asupra vitezei reacțiilor enzimatice	234
IV.2.3	Influența temperaturii mediului asupra vitezei reacțiilor enzimatice	260
IV.2.4	Influența pH-ului mediului asupra vitezei reacțiilor enzimatice	266
IV.2.5	Influența efectorilor asupra vitezei reacțiilor enzimatice	273
IV.3	**CINETICA SCATCHARD**	286
V	**METODE ŞI TEHNICI UTILIZATE ÎN ENZI-**	291

BCU IAȘI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

	MOLOGIE	
V.1	**SURSE DE ENZIME**	292
V.2	**EXTRACȚIA ENZIMELOR**	302
V.3	**PURIFICAREA ENZIMELOR**	309
V.3.1	Dializa	309
V.3.2	Purificarea enzimelor prin gel-cromatografie	310
V.3.3	Fracționarea enzimelor cu ajutorul schimbătorilor de ioni	312
V.3.4	Fracționarea enzimelor cu ajutorul adsorbanților	313
V.3.5	Separarea enzimelor prin cromatografia de afinitate	314
V.4	Cristalizarea enzimelor	314
V.5	Determinarea activității enzimatice	315
V.5.1	Metode spectrofotometrice de determinare a activității enzimelor	316
V.5.2	Metode fluorimetrice de determinare a activității enzimelor	317
V.5.3	Metode titrimetrice de determinare a activității enzimelor	317
V.5.4	Metode calorimetrice	318
V.5.5	Metode polarimetrice	318
VI	**MECANISME DE ACȚIUNE ALE UNOR ENZIME**	319
VI.1	**MECANISME DE ACȚIUNE ALE UNOR ENZIME MONOCOMPONENTE**	319
VI.2	**MECANISME DE ACȚIUNE ALE UNOR METALOENZIME**	324
VI.3	**MECANISME DE ACȚIUNE ALE UNOR ENZIME NAD(P)$^+$-DEPENDENTE**	340
VI.4	**MECANISME DE ACȚIUNE ALE UNOR FLAVOENZIME**	358
VI.5	**MECANISME DE ACȚIUNE ALE UNOR ENZIME TPP-DEPENDENTE**	371
VI.6	**MECANISME DE ACȚIUNE ALE UNOR ENZIME PIRIDOXALFOSFAT-DEPENDENTE**	374
VI.7	**MECANISME DE ACȚIUNE ALE UNOR ENZIME CE CONȚIN COA-SH ÎN CALITATE**	380

BCU IASI CENTRALA UNIVERSITARA LIBRARY

	DE COFACTOR	
VI.8	**CONVERSIA ZIMOGENILOR ÎN ENZIME ACTIVE**	383
VII	**ASPECTE ENERGETICE ALE REACȚIILOR ENZIMATICE**	393
VII.1	**MOLECULE MACROERGICE**	398
VII.2	**SCHIMBUL ADP/ATP**	405
VII.3	**STRUCTURA ŞI MECANISMUL DE ACȚIUNE AL CREATIN-KINAZEI**	407
VII.4	**ATP-AZELE ŞI INTERMEDIARII FOSFORILAȚI**	409
VIII	**REGLAREA ACTIVITĂȚII ENZIMELOR**	416
VIII.1	**ENZIME ALOSTERICE**	416
VIII.2	**REGLAREA ACTIVITĂȚII ENZIMATICE PRIN CONVERSIA ZIMOGENILOR ÎN ENZIME ACTIVE**	421
VIII.3	**REGLAREA BIOSINTEZEI ENZIMELOR**	421
VIII.3.1	Inducția biosintezei enzimelor	422
VIII.3.2	Represia biosintezei enzimelor	423
VIII.3.3	Mecanismul reglării biosintezei enzimelor	423
IX	**ENZIME IMOBILIZATE**	426
IX.1	**NOȚIUNEA DE ENZIMĂ IMOBILIZATĂ**	426
IX.2	**METODE DE IMOBILIZARE**	427
IX.2.1	Metode fizice de imobilizare a enzimelor	427
IX.2.1.1	Imobilizarea enzimelor prin adsorbție	428
IX.2.1.2	Imobilizarea enzimelor prin includere în geluri	429
IX.2.1.3	Imobilizarea enzimelor prin microîncapsulare	430
IX.2.1.4	Alte metode fizice de imobilizare a enzimelor	432
IX.2.2	Metode chimice de imobilizare a enzimelor	432
IX.2.2.1	Imobilizarea enzimelor prin legare covalentă	433
IX.2.2.2	Imobilizarea enzimelor cu ajutorul liganzilor	433
IX.2.3	Metode de imobilizare a celulelor întregi	436
IX.3	**TEHNICI DE IMOBILIZARE A ENZIMELOR ŞI CELULELOR**	436
IX.4	Caracteristicile cinetice şi funcționale ale enzimelor imobilizate	437

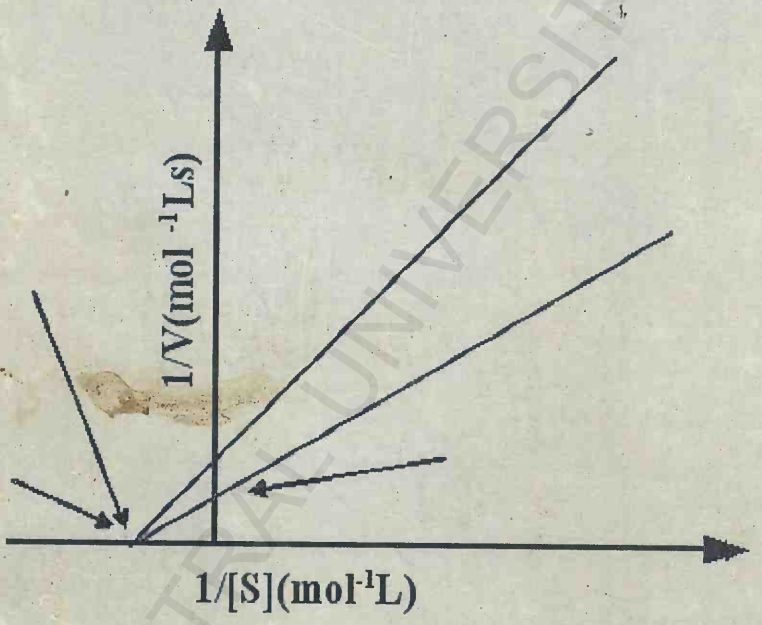
BCU IAŞI UNIVERSITY LIBRARY

IX.4.1	Alegerea condițiilor optime de imobilizare	438
IX.4.2	Determinarea parametrilor cinetici şi funcționali ai enzimelor imobilizate	442
X	**UTILIZAREA PRACTICĂ A ENZIMELOR**	448
X.1	**IMPORTANȚA ENZIMELOR PENTRU PRACTICA MEDICALĂ**	449
X.1.1	Determinarea activității enzimelor în diagnostic şi tratament	450
X.1.2	Enzimoterapia	455
X.1.3	Enzimele în pediatrie	459
X.1.4	Enzimele în oncologie	460
X.1.5	Noțiuni generale asupra metodelor imunoenzimatice de analiză	460
X.1.5.1.	Generalități	460
X.1.5.2	Noțiuni generale privind structura chimică şi rolul biologic al anticorpilor	461
X.1.5.3	Principiile generale ale metodelor imunologice de dozare	473
X.1.5.4	Utilizarea markerilor enzimatici în imunoanaliză	478
X.1.5.5	Tehnici de marcare	482
X.1.5.6	Metode de dozare	489
X.1.5.7	Noțiuni generale asupra metodelor enzimo-imunocitochimice de analiză	506
X.1.5.8	Sisteme de amplificare a sensibilității metodelor imunoenzimatice	514
X.2	**UTILIZAREA ENZIMELOR ÎN INDUSTRIE**	519
X.2.1	Utilizarea enzimelor în industria alimentară	519
X.2.2	Utilizarea enzimelor în industria farmaceutică	521
X.2.3	Utilizarea enzimelor în alte domenii	521
X.3	**APLICAȚIILE PRACTICE ALE ENZIMELOR IMOBILIZATE**	522
	BIBLIOGRAFIE	524

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY



ISBN 973-702-451-6

SCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY